

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

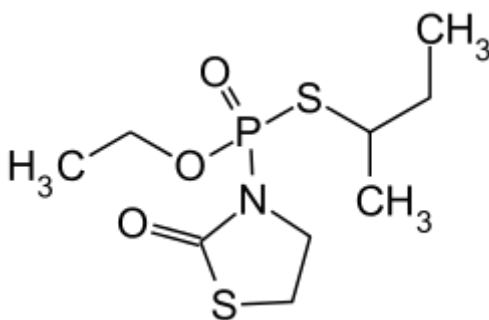


Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

***«Απομόνωση βακτηρίων που διασπούν το
οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο fosphiazate»***



ΛΑΓΟΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ

Λάρισα 2018

«Απομόνωση βακτηρίων που διασπούν το οργανοφωσφορικό
εντομοκτόνο *fosthiazate*»

«*Isolation of bacteria capable of degrading the organophosphorus
insecticide fosthiazate*»

Υπεύθυνος Καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή :

- Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας φυτών, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Λιαδάκη Καλλιόπη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας , του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την πολύτιμη καθοδήγηση και πολύ σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε στην οργάνωση των πειραμάτων, στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων, στη συγγραφή και στη διόρθωση του κειμένου της πτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην μεταδιδάκτορα Δρ. Chiara Perruchon και στις υποψήφιες διδάκτορες Κωνσταντίνα Ρουσίδου και Αθανασία Κατσούλα για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή τους σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Ακόμη, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία κατά τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την συνεχή υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας περιορισμένος αριθμός γεωργικών φαρμάκων εδάφους, που ανήκουν κατά κύριο λόγο στις χημικές ομάδες των οργανοφωσφορικών και των καρβαμιδικών, είναι διαθέσιμος για τον έλεγχο των εδαφογενών παρασίτων της πατάτας. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πατάτα καλλιεργείται ως μονοκαλλιέργεια δεν ευνοεί την εναλλαγή αγροχημικών σκευασμάτων. Αυξάνεται έτσι ο κίνδυνος για τη μείωση της αποτελεσματικότητας των γεωργικών φαρμάκων λόγω μικροβιακής προσαρμογής και πιθανότητας εμφάνισης του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Το συγκεκριμένο φαινόμενο εμφανίζεται μετά από επανειλημμένη εφαρμογή του ίδιου παρασιτοκτόνου στον ίδιο αγρό για πολλά χρόνια. Το fosthiazate είναι ένα οργανοφωσφορικό νηματοδωκτόνο που χρησιμοποιείται για την προστασία των καλλιεργιών πατάτας. Πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος κατέδειξαν για πρώτη φορά μειωμένη βιολογική αποτελεσματικότητα του fosthiazate σε περιοχή μονοκαλλιέργειας πατάτας, στο Νευροκόπι Δράμας, λόγω του φαινομένου της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.

Στόχος λοιπόν της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την αυξημένη βιοαποδόμηση του fosthiazate σε αυτά τα εδάφη. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες εμπλουτισμού σε θρεπτικά μέσα MSM και MSM+N, όπου το fosthiazate αποτελούσε τη μοναδική πηγή C και N ή C αντίστοιχα, και εμβολιάστικαν με έδαφος που εμφάνιζε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του fosthiazate. Από τις εμπλουτισμένες καλλιέργειες απομονώθηκαν τέσσερις βακτηριακές καλλιέργειες που αποδομομούσαν ενεργά το fosthiazate μόνο στο μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο LB. Ανάλυση του μοριακού αποτυπώματος των παραπάνω καλλιεργειών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) έδειξε ότι μόνο οι δύο ήταν αμιγείς και περιελάμβαναν ένα βακτήριο του είδους *Variovorax boronicumulans*, όπως ταυτοποιήθηκε με αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου και ακόλουθη φυλογενετική ανάλυση. Η τρίτη καλλιέργεια ήταν μικτή και περιελάμβανε το ίδιο στέλεχος *V. boronicumulans* όπως και οι δύο αμιγείς ως κύριο μέλος. Τέλος η τέταρτη καλλιέργεια ήταν επίσης μικτή με κύριο μέλος ένα στέλεχος του είδους *Cupriavidus necator*. Το στέλεχος *V. boronicumulans* ήταν σε θέση να αποδομεί αποτελεσματικά έως 100 mg/L του fosthiazate σε υγρές καλλιέργειες LB (DT50 = 11,2 ημέρες), αλλά η ικανότητα αποικοδόμησης μειώθηκε σε υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης (500 mg/L, DT50 = 20 ημέρες). Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά για την απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate. Περαιτέρω μελέτες θα επικεντρωθούν στον χαρακτηρισμό της μεταβολικής οδού και του γενετικού δικτύου του στελέχους *V. Bormonicumulans*.

ABSTRACT

A limited number of soil pesticides, which mainly belong to the chemical groups of organophosphates and carbamates, are available for the control of potato soil parasites. This, coupled with the fact that potatoes are cultivated as monocultures, does not favor the rotation in the use of agrochemicals. This increases the risk for reduced biological efficacy due to microbial adaptation and the development of accelerated microbial degradation. This phenomenon occurs in the agricultural soils after repeated application of the same pesticide in the same field for many years. Fosthiazate is an organophosphorus nematicide used to protect potato crops. Recent studies which carried out in the Laboratory of Plant Biotechnology and Environmental Biotechnology demonstrated for the first time a reduced biological efficacy of fosthiazate in a potato cultivation in Nevrokopi Drama, which was showed to be the outcome of accelerated biodegradation of fosthiazate.

The aim of this study was the isolation and characterization of bacteria responsible for the increased biodegradation of fosthiazate in these soils. For this purpose, enrichment cultures were prepared in MSM and MSMN selective growth media, where fosthiazate was the sole source of C and N or C respectively and inoculated with soil that showed accelerated biodegradation of fosthiazate. From the enriched cultures four bacterial cultures that actively degraded the fosthiazate only in the non-selective LB medium were isolated. Analysis of the molecular footprint of those cultures by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) showed that only two were pure and composed of a *Variovorax boronicummulans* strain, as identified by sequencing of the 16S rRNA gene followed by phylogenetic analysis. The third culture was mixed and included the same *V. Bormonicummulans* strain as a main member. Finally, the fourth culture was also mixed with the main member being a *Cupriavidus necator* strain. The *V. bormonicummulans* strain was able to degrade effectively up to 100 mg/L of fosthiazate in liquid LB cultures (DT50 = 11.2 days), but the degradation efficiency decreased to higher concentration levels (500 mg/L, DT50 = 20 days). This study is the first report on the isolation of bacteria degrading the fosthiazate. Further studies will focus on the characterization of the metabolic pathway and the genetic network of the *V. bormonicummulans* strain

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1	Γεωργικά φάρμακα – Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά.....	8
1.2	Μικροβιακή αποδόμηση	10
1.3	Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση	11
1.3.1	Σταθερότητα επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης	13
1.3.2	Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση.....	14
1.4	Οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα.....	14
1.4.1	Δομή και μηχανισμός δράσης.....	15
1.4.2	Μικροβιακή αποδόμηση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	16
1.4.3	Επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων	17
1.4.4	Μικροοργανισμοί που αποδομούν οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα	18
1.5	Fosthiazate	20
1.5.1	Περιβαλλοντική τύχη του fosthiazate	21
1.6	Σκοπός του πειράματος	22
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1	Δείγματα εδαφών	23
2.2	Γεωργικά φάρμακα.....	23
2.3	Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης	23
2.3.1	Παρασκευή θρεπτικών μέσων MSMN και MSM	24
2.3.2	Παρασκευή θρεπτικού μέσου Mandelbaum + Μίγμα αμινοξέων	25
2.3.3	Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (Luria Bertani)	26
2.4	Μέθοδος ανάλυσης fosthiazate	26
2.5	Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate	27
2.5.1	Προεπεξεργασία του εδάφους	27
2.5.2	Εμπλουτισμός καλλιιεργιών.....	27
2.5.3	Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate	28
2.6	Μοριακή ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων	29
2.6.1	Εξαγωγή DNA.....	29

2.6.2	PCR ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου	29
2.6.3	Μοριακή αποτύπωση DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) των βακτηριακών καλλιεργειών.....	31
2.6.4	Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....	33
2.6.5	Ένθεση σε πλασμιδιακούς φορείς	33
2.6.6	Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα E. coli.....	34
2.6.7	Colony PCR και DGGE ανάλυση των επιλεγμένων αποικιών.....	34
2.6.8	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση.....	35
2.6.9	Ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηρίων και φυλογενετική ανάλυση	35
2.7	Αξιολόγηση της ικανότητας των απομονωθέντων βακτηρίων να αποδομούν υψηλές συγκεντρώσεις του fosthiazate	36
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
3.1	Ένεργοποίηση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους	38
3.2	Αποδόμηση fosthiazate στις καλλιέργειες εμπλουτισμού.....	38
3.3	Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate	40
3.4	Ταυτοποίηση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate.....	45
3.4.1	Εξαγωγή DNA, PCR ενίσχυση και ανάλυση DGGE.....	45
3.4.2	Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα και εξαγωγή πλασμιδιακού DNA, αλληλούχιση και φυλογενετική ανάλυση	48
3.5	Αξιολόγηση της ικανότητας του στελέχους V. boronicumulans 5B να αποδομεί υψηλές συγκεντρώσεις του fosthiazate	54
4	Συζήτηση	57
4.1	Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του fosthiazate	57
4.2	Τελικά Συμπεράσματα	59
4.3	Μελλοντικοί ερευνητικοί στόχοι	59
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γεωργικά φάρμακα – Περιβαλλοντική Τύχη και Συμπεριφορά

Τα γεωργικά φάρμακα (γ.φ.) διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος του εχθρού που καταπολεμούν, τον τρόπο δράσης τους, την τοξικότητα τους, τη χημική δομή τους και τον τρόπο παρασκευής-σύνθεσης τους. Ανάλογα με το είδος του εχθρού ταξινομούνται σε ακαρεοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και νηματωδοκτόνα. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους (ικανότητα κίνησης μέσα στα φυτά) διακρίνονται σε επαφής (παραμένουν στην επιφάνεια του φυτού) ή διασυστημικά (εισέρχονται και κυκλοφορούν μέσα στους φυτικούς ιστούς) (1). Επίσης τα γ.φ. μπορούν να είναι συνθετικές χημικές ενώσεις (ανόργανες και οργανικές), δηλαδή προϊόντα χημικής σύνθεσης στο εργαστήριο ή φυσικής προέλευσης (βιολογικά γεωργικά φάρμακα-biopesticides) δηλαδή προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού φυτών, μικροοργανισμών και εντόμων (2). Με βάση την χημική τους δομή τα γ.φ. μπορούν να διαχωριστούν στις παρακάτω βασικές ομάδες:

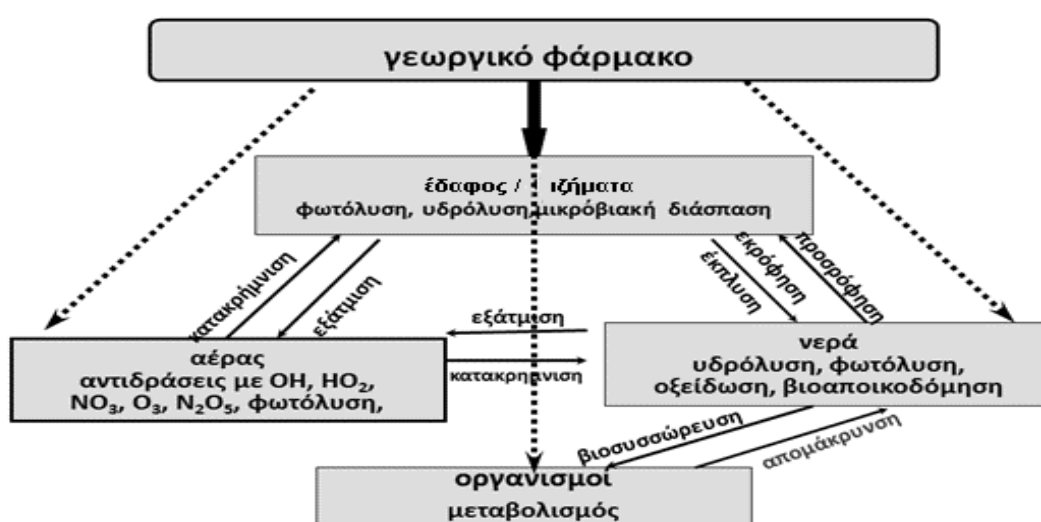
1. Οργανοχλωριωμένα
2. Οργανοφωσφορικά
3. Πυρεθρινοειδή
4. Καρβαμιδικά
5. Νεονικοτινοειδή
6. Διθειοκαρβαμιδικά
7. Αζόλες
8. Παράγωγα ουρίας
9. Φαινυλαμίδια
10. Τριαζίνες
11. Ανιλινοπυριμιδίνες
12. Ανιλιδοπυριμιδίνες

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση γ.φ. έχει αυξήσει σημαντικά την ποσότητα και έχει βελτιώσει την ποιότητα της τροφής για τον αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό, παράλληλα όμως, έχει σημειώσει αύξηση των δυσμενών επιπτώσεων σε οργανισμούς μη – στόχους, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Επίσης η εκτεταμένη και μη ορθή χρήση των γεωργικών φαρμάκων έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί κινδύνους ρύπανσης και υποβάθμισης του περιβάλλοντος. Με βάση μελέτη του Ο.Η.Ε., εκτιμάται ότι από τη συνολική ποσότητα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται για αγροτικούς σκοπούς μόνο το 1% καταλήγει στο καλλιεργούμενο φυτό, ενώ το υπόλοιπο ρυπαίνει το περιβάλλον, δηλαδή το έδαφος, τον αέρα και κυρίως το νερό (3). Στην Εικόνα 1 φαίνονται συνοπτικά οι διαδικασίες αποδόμησης των γ.φ. στο περιβάλλον.

Υπάρχουν δύο κύριες οδοί μέσω των οποίων τα γ.φ. εισέρχονται στο έδαφος: μετακίνηση του ψεκαστικού νέφους στο έδαφος ύστερα από διαφυλλική εφαρμογή (4) και απευθείας εφαρμογή στο έδαφος για καταπολέμηση οργανισμών φυτικών εχθρών που διαβιούν στο έδαφος (5).

Μετά την εισροή των γ.φ. στο έδαφος είναι απαραίτητη η εκτίμηση της υπολειμματικότητας τους (6,7) που καθορίζεται από βασικές διεργασίες όπως είναι η προσρόφηση – εκρόφηση στα εδαφικά κολλοειδή και η βιολογική ή αβιοτική αποδόμηση τους. Κατά τη μελέτη των ζητημάτων αυτών, ιδιαίτερα σε πειράματα στον αγρό, είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών που επιτρέπουν την χωρίς παρεμβολές και ακριβής ποσοτικοποίηση τους (4).

Η περιβαλλοντική τύχη των γ.φ. στο έδαφος διέπεται από μια ποικιλία πολύπλοκων δυναμικών φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών, που ελέγχουν άμεσα τη μεταφορά των γεωργικών φαρμάκων εντός του εδάφους και τη μεταφορά τους από το έδαφος στο νερό ή στις τροφές. Αυτές είναι η βιολογική και χημική αποδόμηση, η προσρόφηση-εκρόφηση, η επιφανειακή απορροή, η έκπλυση και η πρόσληψη από τα φυτά. Η σχετική σημασία αυτών των διαδικασιών ποικίλλει ανάλογα με τη χημική φύση των γ.φ. και τις ιδιότητες του εδάφους, αλλά δύο διεργασίες είναι αυτές που έχουν καθοριστικό ρόλο: η αποδόμηση και η προσρόφηση (8).



Εικόνα 1 Σχηματική αναπαράσταση των διεργασιών αποδόμησης γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον

1.2 Μικροβιακή αποδόμηση

Μικροβιακή αποδόμηση ή βιοαποδόμηση (biodegradation ή biotransformation) ονομάζεται η διάσπαση οργανικών ουσιών σε μικρότερα μόρια μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από μικροοργανισμούς. Στην διάρκεια της μικροβιακής αποδόμησης σύνθετα οργανικά μόρια μετατρέπονται σε πιο απλά ή τοξικές ουσίες σε λιγότερο ή μη-τοξικές, είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσίας οξυγόνου) είτε υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσίας οξυγόνου). Οι πιο πολλοί μικροοργανισμοί, που κατοικούν στο έδαφος, όπου το οξυγόνο είναι άφθονο αποδομούν τα γεωργικά φάρμακα μέσω του αερόβιου μεταβολισμού τους. Όταν ένα γ.φ. υφίσταται πλήρη αερόβιο μεταβολισμό, ανοργανοποιείται και μετατρέπεται πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή άλλων τελικών προϊόντων όπως το μεθάνιο.

Η διάσπαση των οργανικών ουσιών που πραγματοποιείται από τους μικροοργανισμούς έχει ως σκοπό την επιβίωση και την αύξηση τους. Σε ένα μικροβιακό κύτταρο λαμβάνουν χώρα δύο βασικές κατηγορίες μεταβολικών αντιδράσεων, ο αναβολισμός και ο καταβολισμός. Οι διεργασίες του αναβολισμού οδηγούν στην παραγωγή βιομάζας, δηλαδή ανάπτυξη του μικροοργανισμού, και απαιτούν την ύπαρξη πηγής άνθρακα. Από την άλλη μεριά οι καταβολικές αντιδράσεις οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας που είναι απαραίτητη για τη διατήρηση και ανάπτυξη των οργανισμών, απαιτούν δηλαδή μια πηγή ενέργειας.

Τα γ.φ. χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας ταυτόχρονα. Η εξασφάλιση ενέργειας γίνεται μέσω οξειδωσης των γεωργικών φαρμάκων διαμέσου μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, στην οποία ο ρόλος είναι το αναγωγικό σώμα το δε ρόλο του οξειδωτικού έχουν διάφορες ενώσεις, ανάλογα με τον τύπο της διαδικασίας του μεταβολισμού (αερόβια αναπνοή , αναερόβια αναπνοή και ζύμωση).

Η ύπαρξη και η ένταση του φαινομένου της μικροβιακής αποδόμησης επηρεάζονται τόσο από το μέσο στο οποίο γίνεται η αποδόμηση (έδαφος) όσο και από τους μικροοργανισμούς-αποδομητές και σε πολλές περιπτώσεις οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν (9). Στο έδαφος η μικροβιακή διάσπαση των γεωργικών φαρμάκων γίνεται από διάφορες ομάδες μικροοργανισμών όπως μύκητες, βακτήρια, ακτινοβακτήρια και άλγη (10). Η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου μπορεί να πραγματοποιηθεί με την δράση ενός μικροοργανισμού ή συχνότερα ομάδας (κοινοπραξίες) μικροοργανισμών (11).

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί του εδάφους αναπτύσσονται σε λεπτά στρώματα που περιβάλλουν τα κολλοειδή του εδάφους και χαρακτηρίζονται ως βιοστρώματα. Ταχύτερη μικροβιακή αποδόμηση παρατηρείται σε περιοχές στις

οποίες επικρατούν συνθήκες υψηλής υγρασίας και θερμοκρασίας (12). Υψηλότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί και επομένως υψηλότερη μικροβιακή δραστηριότητα παρατηρείται στα επιφανειακά εδαφικά στρώματα με αποτέλεσμα ταχύτερη αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων να πραγματοποιείται στο επιφανειακό έδαφος (13). Αντίθετα οι oligοτροφικές συνθήκες που επικρατούν στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα έχουν ως αποτέλεσμα να υπάρχουν μικρότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί με χαμηλότερη δραστηριότητα και επομένως να παρατηρούνται βραδύτεροι ρυθμοί αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Όπως όλοι οι κανόνες έχουν τις εξαιρέσεις τους, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις όπου ο ρυθμός αποδόμησης συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα είναι ο ίδιος ή και υψηλότερος σε σύγκριση με το αντίστοιχο επιφανειακό έδαφος (14).

Για να πραγματοποιηθεί η αποδόμηση ενός γεωργικού φαρμάκου, οι μικροοργανισμοί του εδάφους ή τα καταβολικά ένζυμα που παράγουν πρέπει να έρθουν σε επαφή με την ουσία και στη συνέχεια αυτή ή τα προϊόντα του μεταβολισμού της να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου (11). Η πλήρης αποδόμηση ενός οργανικού μορίου είναι συνήθως προϊόν μικροβιακής αποδόμησης. Μέσω της διαδικασίας αυτής οι μικροοργανισμοί αυξάνουν τη βιομάζα τους χρησιμοποιώντας τον άνθρακα των οργανικών ενώσεων ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Με τον τρόπο αυτό αυξάνουν τους πληθυσμούς τους σε αριθμό και μέγεθος. Η μελέτη και απομόνωση μικροοργανισμών υπεύθυνων για την αποδόμηση γεωργικών φαρμάκων που χρησιμοποιούν αυτά ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους έδειξε ότι αυτά συνήθως είναι βακτήρια, μύκητες και ακτινοβακτήρια (15). Η μικροβιακή διάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα διαμέσου μεταβολικών διεργασιών, όπως ανοργανοποίηση, συµμεταβολισμός, πολυμερισμός, συμπλοκοποίηση και συσσώρευση, είτε έµμεσα μέσα από επιδράσεις της μικροβιακής δραστηριότητας που μεταβάλλουν το pH και ενεργοποιούν νέες οξειδοαναγωγικές διεργασίες (16,17).

1.3 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Πριν από την αποδόμηση πολλών οργανικών ενώσεων, υπάρχει μια χρονική περίοδος κατά τη διάρκεια της οποίας, παρατηρείται μηδαμινή απομάκρυνση της χημικής ουσίας. Αυτή η φάση, που αναφέρεται και ως φάση υστέρησης (lag phase) υποδεικνύει μια περίοδο εγκλιματισμού ή προσαρμογής των μικροοργανισμών στην χημική δομή της ουσίας στην οποία εκτέθηκαν.

Με την πάροδο του χρόνου έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα γ.φ. χάνουν την αποτελεσματικότητά τους. Η μείωση αυτή της αποτελεσματικότητας έχει αποδοθεί είτε στην επικράτηση ανθεκτικών στελεχών εντόμων, μυκήτων ή βιοτύπων φυτών ή

(ειδικότερα για τα γ.φ. που εφαρμόζονται στο έδαφος) στη ταχύτατη αποδόμηση του γεωργικού φαρμάκου από τους μικροοργανισμούς του εδάφους που ανέπτυξαν κατά την διάρκεια της φάσης προσαρμογής ενζυμικά συστήματα κατάλληλα για την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση και προκύπτει για ορισμένες ομάδες γεωργικών φαρμάκων ύστερα από την επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου γεωργικού φαρμάκου στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών **(18)**.

Η επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση μπορεί να εμφανιστεί μετά από μια μόνο εφαρμογή ή μετά από πολυετής εφαρμογές και είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ γεωργικών φαρμάκων και μικροοργανισμών **(19)**. Επίσης μπορεί να συμβεί από την συνεργιστική δράση δύο ή περισσότερων μικροοργανισμών **(20)**. Η εμφάνιση της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μικροβιακού πληθυσμού ικανού να χρησιμοποιήσει το γεωργικό φάρμακο σαν πηγή θρεπτικών συστατικών με σκοπό την αύξηση και ανάπτυξή του. **(21)**

Η μικροβιακή κοινότητα για να αποδομήσει μια συγκεκριμένη χημική ουσία στο έδαφος θα πρέπει να εμφανίσει α) μια αύξηση στη δραστηριότητα αποδόμησης ενός περιορισμένου αριθμού μικροοργανισμών λόγω, της εκλεκτικής έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν καταβολικά ένζυμα, β) μια αύξηση στον αριθμό των βιοαποδομητών λόγω, της μικροβιακής αύξησης γ) τη μετακίνηση άλλων ικανών μικροοργανισμών εξαιτίας της αποδόμησης στην περιοχή της εφαρμογής και δ) τη εξελικτική εμφάνιση νέων καταβολικών ενζύμων για τη χρήση της χημικής ουσίας ως πηγή ενέργειας. Έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια είναι οι κυρίαρχοι παράγοντες της επιταχυνόμενης αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων ενώ, οι μύκητες έχουν περιορισμένο ρόλο στο φαινόμενο αυτό **(22)**.

Το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης είναι αποτέλεσμα της σταδιακής μικροβιακής προσαρμογής στο εφαρμοζόμενο γεωργικό φάρμακο και στην ακραία του μορφή οδηγεί συνήθως σε σημαντική μείωση στην αποτελεσματικότητα του **(23)**. Αποτέλεσμα της επιταχυνόμενης αποδόμησης είναι η αποτυχία του γεωργικού φαρμάκου να περιορίσει αποτελεσματικά τους εχθρούς-στόχους λόγω της μεγάλης μείωσης της παραμονής της στο έδαφος. Η επιταχυνόμενη αποδόμηση είχε αρχικά θεωρηθεί ως ευεργετική διεργασία που οδηγεί στην ταχύτατη μείωση των ανεπιθύμητων υπολειμμάτων των γ.φ. που εφαρμόζονται στο έδαφος και συνεπώς μείωνε την πιθανότητα μετακίνησής τους στα υπόγεια και επιφανειακά νερά **(24)** . Παρόλα αυτά το φαινόμενο αυτό μπορεί να επιφέρει οικονομικές απώλειες στους καλλιεργητές, αφού μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της αποτελεσματικότητας ορισμένων γεωργικών φαρμάκων λόγω της ταχύτατης μείωσης της συγκέντρωσής τους σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που απαιτούνται για τον έλεγχο των οργανισμών- στόχων **(12)**.

Το ποσοστό αποδόμησης και η έκταση της μικροβιακής αύξησης κατά τη διάρκεια της αποδόμησης επηρεάζονται από τη δομή του γ.φ. Συνήθως, γεωργικά φάρμακα με απλές χημικές δομές που χαρακτηρίζονται από υψηλή διαλυτότητα και χαμηλή ικανότητα προσρόφησης μπορούν εύκολα να υποστηρίξουν τη μικροβιακή αύξηση και εμφανίζουν πιο γρήγορα προβλήματα επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης. Γεωργικά φάρμακα που χαρακτηρίζονται από χημικές δομές που εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με φυσικές ουσίες που απαντούν οι μικροοργανισμοί στο φυσικό τους περιβάλλον όπως το έδαφος αποδομούνται ευκολότερα από τις περισσότερες μικροβιακές κοινότητες αμέσως μετά από την εισαγωγή τους στο περιβάλλον. Αντίθετα, τα γ.φ. με δομή διαφορετική από τις περισσότερες φυσικές ουσίες (ξеноβιοτικές ενώσεις) αποδομούνται αργά λόγω του γεγονότος ότι, οι μικροοργανισμοί δεν κατέχουν εξαρχής ενζυμικά συστήματα για την αποδόμηση των συγκεκριμένων γεωργικών φαρμάκων. Τέτοια γ.φ. εμφανίζουν γενικότερα ανθεκτικότητα στην μικροβιακή αποδόμηση και συνήθως δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευαισθησία στην επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση (25).

Τα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως δομή, θρεπτική κατάσταση, οργανική ουσία και pH αποτελούν παραμέτρους, με σημαντικές επιδράσεις στον ρυθμό αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Μεταβολή σε ένα από τα χαρακτηριστικά του εδάφους μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη διαθεσιμότητα ή την αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων συχνά με εντελώς διαφορετικό τρόπο (26). Από τους εδαφικούς παράγοντες το pH και η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία επηρεάζουν κυρίως την εμφάνιση και ανάπτυξη της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης.

Ακόμη και μικρές αλλαγές στο pH επιφέρουν σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση και δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας. Στα αλκαλικά εδάφη ευνοείται η εμφάνιση του φαινομένου, είτε άμεσα με επίδραση στη χημική σταθερότητα του γ.φ. είτε έμμεσα με επίδραση στη σύνθεση και δραστηριότητα της μικροβιακής κοινότητας (15).

Αύξηση της περιεκτικότητας του εδάφους σε οργανική ουσία συνεπάγεται κατά κανόνα αύξηση της προσρόφησης των γ.φ. στο έδαφος με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθεσιμότητάς τους για αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς του εδάφους.

1.3.1 Σταθερότητα επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης

Η σταθερότητα ή εμμονή του φαινομένου της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης από την στιγμή που θα παρατηρηθεί σε ένα έδαφος μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών εδαφών και μεταξύ διαφορετικών γεωργικών φαρμάκων. Η χρονική στιγμή, στην οποία ένα έδαφος που εμφανίζει πρόβλημα

επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης μπορεί ξανά να δεχθεί με ασφάλεια εφαρμογή με το ίδιο γεωργικό φάρμακο εξαρτάται από τη δόση και συχνότητα εφαρμογής, τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας και την ικανότητα των μικροοργανισμών να χρησιμοποιούν την ουσία σαν πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών (27). Σημαντικές διαφορές στην εμμονή του φαινομένου έχουν καταγραφεί μεταξύ οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών νηματωδοκτόνων (28)

1.3.2 Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Διασταυρωτή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα γεωργικό φάρμακο αποδομείται ταχύτατα σε έδαφος στο οποίο δεν έχει καταγραφεί προηγούμενη χρήση του, αλλά το έδαφος έχει εκτεθεί σε κάποιο άλλο γεωργικό φάρμακο με παρόμοια χημική δομή. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει καταγραφεί ότι η αποδόμηση ενός γ.φ. μπορεί να γίνεται ευκολότερα μετά από εφαρμογή στο έδαφος διαφορετικού, αλλά της ίδιας χημικής ομάδας, γεωργικού φαρμάκου, παρά ύστερα από εφαρμογή του ίδιου του γεωργικού φαρμάκου που μελετούμε (25).

1.4 Οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα

Οι συνθετικές οργανοφωσφορικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως ως γεωργικά φάρμακα από το 1937 (29) . Τα τελευταία 60 χρόνια περισσότερες από 150 διαφορετικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την προστασία των καλλιεργειών (30) κυρίως ως εντομοκτόνα και νηματωδοκτόνα .Ακόμα και σήμερα αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό των χρησιμοποιούμενων γεωργικών φαρμάκων παγκοσμίως . Στις ΗΠΑ αποτελούν περίπου το 33% , ενώ στην Ε.Ε περίπου το 15% (31,32) . Στην Ελλάδα χρησιμοποιούνται ευρέως κυρίως στις μονοκαλλιέργειες πατάτας για την αντιμετώπιση των νηματωδών. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια η χρήση των οργανοφωσφορικών γ.φ. παρουσιάζει μείωση κυρίως λόγω της χρησιμοποίησης νέων πιο εξειδικευμένων ενώσεων, αποτελεσματικών σε μικρότερες δόσεις, όπως τα νεονικοτινοειδή(31,32) .

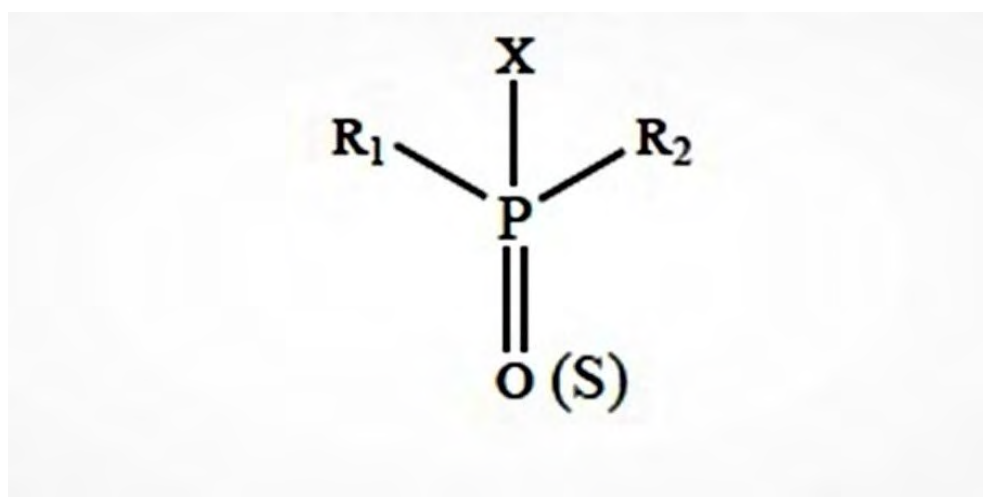
Τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα παρότι δεν παρουσιάζουν μεγάλη υπολειματικότητα στο έδαφος, δεδομένου ότι σε γενικές γραμμές είναι ευαίσθητα σε μικροβιακή αποδόμηση, ωστόσο εγκυμονούν κινδύνους για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Αυτό οφείλεται στην υψηλή τοξικότητα που έχουν για τα θηλαστικά αλλά και την οξεία και χρόνια τοξικότητα που προκαλούν σε άλλους οργανισμούς μη-στόχους όπως πτηνά, αμφίβια και άλλους υδρόβιους οργανισμούς (33,34). Στον άνθρωπο οξεία και χρόνια έκθεση έχει συσχετισθεί με διάφορες νευρολογικές και μυικές διαταραχές (35,34). Μάλιστα κάθε χρόνο καταγράφονται

περίπου 200.000 περιστατικά δηλητηριάσεων λόγω της χρήσης οργανοφωσφορικών γ.φ. παγκοσμίως (36).

1.4.1 Δομή και μηχανισμός δράσης

Η υψηλή τοξικότητα των οργανοφωσφορικών ενώσεων οφείλεται στη δομή τους και επομένως στον τρόπο δράσης τους προκειμένου να καταπολεμούν, επιβλαβή έντομα, μύκητες και νηματώδεις. Τα οργανοφωσφορικά γ.φ. είναι εστέρες, αμίδια ή θειόλες που προέρχονται από το φωσφορικό, το φωσφονικό ή το φωσφοραμιδικό οξύ (37). Ο γενικός χημικός τύπος των οργανοφωσφορικών γ.φ. παρουσιάζεται στην Εικόνα 2. Τα R_1 και R_2 είναι συνήθως αρυλικές ή αλκυλικές ομάδες οι οποίες δεσμεύονται στο άτομο του φωσφόρου είτε απευθείας (φωσφινικά οργανοφωσφορικά) είτε μέσω ατόμου οξυγόνου (φωσφορικά οργανοφωσφορικά) είτε μέσω ατόμου θείου (φωσφοθειοϊκά οργανοφωσφορικά) είτε τέλος μέσω μίας – NH_2 ομάδας (φωσφοραμιδικά οργανοφωσφορικά). Τέλος η ομάδα X , η οποία ονομάζεται και «αποχωρούσα ομάδα» (επειδή αποσπάται κατά την υδρόλυση των ο.φ. ενώσεων), μπορεί να είναι αλογόνο ή κάποια αλειφατική, αρωματική ή ετεροκυκλική ομάδα.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των οργανοφωσφορικών ενώσεων όπως η πτητικότητα, η λιποδιαλυτότητα και η υδατοδιαλυτότητα ποικίλουν και εξαρτώνται από τους υποκαταστάτες στις θέσεις R_1 , R_2 και X . Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως γεωργικά φάρμακα είναι συνήθως λιγότερο πτητικές, στερεές σε θερμοκρασία δωματίου και περισσότερο σταθερές σε υδατικά διαλύματα (38).



Εικόνα 2 Γενικός χημικός τύπος των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Ο τρόπος δράσης των οργανοφωσφορικών γ.φ. περιλαμβάνει την αναστολή της διάσπασης της ακετυλοχολίνης.(35,75) Η ακετυλοχολίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση νευρικών ερεθισμάτων στον εγκέφαλο, στα σκελετικά και στα μυϊκά

συστήματα. Ωστόσο, μετά τη μετάδοση, η ακετυλοχολίνη πρέπει να υδρολυθεί για να αποφευχθεί η υπερδιέγερση των νευρικών συστημάτων. Αυτή η υδρόλυση προκαλείται από μία εστεράση που ονομάζεται ακετυλοχολινεστεράση (AChE), και έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό χολίνης και ακέτυλου-CoA. Τα οργανοφωσφορικά γ.φ. δεσμεύονται στην ενεργό θέση της AChE, και στη συνέχεια η αποχωρούσα ομάδα απομακρύνεται από αυτή οδηγώντας σε φωσφορυλιωμένη AChE. Η υδρόλυση της φωσφορυλιωμένης AChE είναι εξαιρετικά αργή και έχει ως αποτέλεσμα την υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος που με τη σειρά του προκαλεί σύγχυση, σπασμούς, παράλυση, αναπνευστική ανεπάρκεια και τελικά θάνατο σε έντομα και θηλαστικά (35).

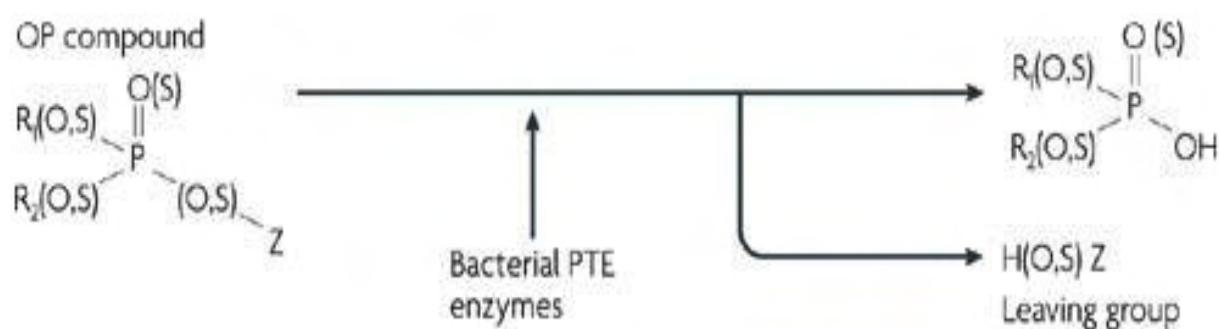
1.4.2 Μικροβιακή αποδόμηση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Ένας απ τους βασικότερους λόγους της αυξανόμενης χρήσης των οργανοφωσφορικών γ.φ. είναι η ταχεία αποδόμηση τους στο περιβάλλον (29). Η υπολειματικότητα των οργανοφωσφορικών γ.φ. στο έδαφος καθορίζεται τόσο από διεργασίες μεταφοράς (προσρόφηση, εκπλυση κ.α.) όσο και από χημική και βιολογική αποδόμηση (35). Η σύσταση του εδάφους, το pH, η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας και η θερμοκρασία είναι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την τύχη των οργανοφωσφορικών γ.φ. και τον επιμέρους ρόλο τους στην υπολειματικότητα τους (35). Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι υπολείμματα οργανοφωσφορικών γ.φ. έχουν βρεθεί σε υπόγεια ύδατα, στο νερό ποταμών και λιμνών, σε εκβολές ποταμών, όσο και στην ατμόσφαιρα. Έχουν επίσης ανιχνευθεί σε νιφάδες χιονιού και στο νερό της βροχής. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα οργανοφωσφορικά γ.φ. μπορούν να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις από τα σημεία εφαρμογής, μέσω του νερού και του αέρα (35).

Από τις διεργασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, τον κυρίαρχο ρόλο για την περιβαλλοντική τύχη των οργανοφωσφορικών γ.φ. παίζει η μικροβιακή αποδόμηση (24,39). Το πρώτο βακτήριο με την ικανότητα να αποδομεί οργανοφωσφορικά γ.φ. απομονώθηκε το 1973 και χαρακτηρίστηκε ως *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 (40). Από τότε έχουν απομονωθεί αρκετά βακτήρια, ορισμένοι μύκητες και κυανοβακτήρια, όπως και κοινοπραξίες βακτηρίων (41,42) με την ικανότητα να αποδομούν οργανοφωσφορικά γ.φ. Οι περισσότεροι από αυτούς μπορούν να αποδομήσουν μόνο ένα ή ένα μικρό φάσμα οργανοφωσφορικών (41). Σε αρκετές περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί χρησιμοποιούν τα οργανοφωσφορικά ως πηγή άνθρακα, αζώτου ή φωσφόρου, ωστόσο έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις μικροοργανισμών που αποδομούν οργανοφωσφορικές ενώσεις στα πλαίσια του **συμμεταβολισμού**. Να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις οι μεταβολίτες που προκύπτουν από το δευτερογενή μεταβολισμό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους μικροοργανισμούς ως πηγή ενέργειας όπως για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί με το methyl parathion (43) είτε να προκαλέσουν

τοξικότητα στους μικροοργανισμούς του εδάφους, όπως ο μεταβολίτης 3,5,5-trichloropyridinol (TCP) του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου chlorpyrifos (44).

Και στις δύο περιπτώσεις, είτε δηλαδή στη χρησιμοποίηση του οργανοφωσφορικού γ.φ. ως πηγή ενέργειας είτε κατά την αποδόμηση του στα πλαίσια του συµµεταβολισµού, οι μικροοργανισµοί του εδάφους χρησιµοποιούν τέσσερις βασικές αντιδράσεις για την αποδόμηση των ενώσεων αυτών: Υδρόλυση, οξείδωση, αλκυλίωση και δι-αλκυλίωση (45). Ιδιαίτερα η υδρόλυση των δεσμών ***P-O-αλκύλιο*** και ***P-O-αρύλιο*** αποτελεί το καθοριστικό βήµα για την αποδόμηση και αποτοξικοποίηση των οργανοφωσφορικών γ.φ. (41). Έχουν χαρακτηριστεί και απομονωθεί διάφορα ένζυμα από μικροοργανισµούς του εδάφους που µπορούν να υδρολύσουν τα οργανοφωσφορικά γ.φ. (Εικόνα 3). Τα ένζυμα αυτά ονοµάζονται φωσφοεστεράσες (PTEs) και µπορούν να βρεθούν επίσης και σε φυτά και ζώα (46). Όσον αφορά τις βακτηριακές PTEs, έχουν µελετηθεί και χαρακτηριστεί τρεις διαφορετικοί τύποι: η **Οργανοφωσφορική υδρολάση (OPH)**, η **Ανυδρολάση των οργανοφωσφορικών οξέων (OPAA)** και η **Υδρολάση του Methyl parathion (MPH)**



Εικόνα 3 Η γενική αντίδραση της υδρόλυσης των οργανοφωσφορικών γ.φ. από τις βακτηριακές φωσφοδιεστεράσες (PTEs)

1.4.3 Επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων

Η εκτεταμένη και επαναλαμβανόμενη εφαρμογή οργανοφωσφορικών γ.φ. σε γεωργικά εδάφη έχει οδηγήσει στην εμφάνιση του φαινομένου της **επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης**. Η ευαισθησία διάφορων οργανοφωσφορικών όπως των εντομοκτόνων parathion (40), diazinon (47,48), isofenphos (49), chlorfevinphos (15) και phorate (50) και των νηματοδωκτών ethoprofos (51,52,53), fenamiphos (54,55,56,57), casudafos (58) όπως και του chlorpyrifos (59,60) έχει μελετηθεί σε βάθος.

Η εμμονή της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης των οργανοφωσφορικών γ.φ. αφού εμφανιστεί διαφέρει από έδαφος σε έδαφος κι από ένωση σε ένωση. Σημαντικό ρόλο παίζουν τόσο η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας και της

ικανότητας των εξειδικευμένων αποδομητικών μικροοργανισμών να επιβιώσουν απουσία του γ.φ. στο έδαφος (61) όσο και αβιοτικοί παράγοντες (24,21) όπως το pH του εδάφους (42,59). Όσον αφορά φαινόμενο της **διασταυρούμενης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης** μεταξύ οργανοφωσφορικών γ.φ., λίγες αναφορές υπάρχουν. Σε εδάφη από καλλιέργειες πατάτας στην Ελλάδα παρατηρήθηκε το φαινόμενο για τα casudafos και ethoprofos, που είναι χημικά ανάλογα (62). Σε άλλη μελέτη σε εδάφη στην Αυστραλία παρατηρήθηκε διασταυρούμενη επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση ανάμεσα στο fenamiphos, στο chlorpyrifos και σε άλλα οργανοφωσφορικά που μελετήθηκαν (61). Στις παραπάνω μελέτες καθώς και στις μελέτες των Racke and Coats (63) και Mitchell and Cain (64), τονίζεται ότι η εμφάνιση του φαινομένου της διασταυρούμενης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης καθορίζεται από το βαθμό ομοιότητας στη χημική δομή των ενώσεων.

1.4.4 Μικροοργανισμοί που αποδομούν οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα

Σημαντικός αριθμός μελετών έχουν ασχοληθεί με την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό μικροοργανισμών υπεύθυνων για την αποδόμηση οργανοφωσφορικών γ.φ. (46,65). Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών έχουν χρησιμοποιήσει τη μέθοδο του εμπλουτισμού καλλιεργιών σε εκλεκτικά μέσα, όπου τα οργανοφωσφορικά γ.φ. αποτελούν τη μοναδική πηγή άνθρακα, αζώτου ή φωσφόρου.

Μέχρι σήμερα πολλοί μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί οι οποίοι είναι ικανοί να αποδομούν οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα είτε ως πηγή ενέργειας είτε στα πλαίσια του δευτρογενούς μεταβολισμού. Υπάρχουν ορισμένα παραδείγματα μυκήτων όπως οι *Trichoderma harzianum* και *Penicillium brevicompactum* που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το chlorpyrifos (66), ή ο *Aspergillus oryzae* ARIFCC 1054 που είχε την ικανότητα αποδόμησης του monocrotophos. Ωστόσο οι κύριοι αποδομητές των γ.φ., επομένως και των οργανοφωσφορικών, στο έδαφος είναι τα βακτήρια (26). Δύο βακτηριακά στελέχη, από τα πρώτα που απομονώθηκαν με την ικανότητα να αποδομούν οργανοφωσφορικά γ.φ., έχουν σήμερα μεγάλη σημασία για βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Πρόκειται για το *Flavobacterium* sp. ATCC 27551, που απομονώθηκε αρχικά ως αποδομητής του diazinon, το οποίο μπορεί να αποδομήσει σχεδόν όλους τους οργανοφωσφορικούς δεσμούς (46) και το *Brevundimonas diminuta*, που απομονώθηκε ως αποδομητής του parathion, το οποίο επίσης εμφάνιζε χαμηλή εξειδίκευση στο είδος των δεσμών C-O-P που μπορεί να διασπάσει (46). Από εδάφη από την Αυστραλία (67) απομονώθηκε το στέλεχος *Enterobacter asburiae* B-14 με την ικανότητα να χρησιμοποιεί τα οργανοφωσφορικά chlorpyrifos, parathion, diazinon, coumaphos και isazofos ως πηγή άνθρακα. Πρόσφατα απομονώθηκε, από λύματα εργοστασίου παραγωγής του εντομοκτόνου chlorpyrifos,

το στέλεχος *Stenotrophomonas acidaminiphila* G1 με την ικανότητα αποδόμησης οκτώ διαφορετικών οργανοφωσφορικών γ.φ. (68). Σε μια άλλη μελέτη μια κοινοπραξία δέκα βακτηριακών στελεχών μπόρεσε να αποδομήσει αποτελεσματικά τα οργανοφωσφορικά chlorpyrifos, monocrotophos όπως και το οργνοχλωριωμένο endosulfan, χρησιμοποιώντας τα ως μοναδική πηγή άνθρακα (69). Εκτός από βακτήρια που διαθέτουν χαμηλή εξειδίκευση στο εύρος των γ.φ. που μπορούν να αποδομήσουν αρκετά μεγάλη σημασία έχει και η απομόνωση στελεχών που να μπορούν να αποδομήσουν πλήρως το γ.φ. . Σε μια μελέτη απομονώθηκε για πρώτη φορά ένα βακτηριακό στέλεχος το *Alcaligenes faecalis* που είχε την ικανότητα να αποδομεί τόσο το chlorpyrifos όσο και τον μεταβολίτη του TCP (60). Το αρχικό αυτό εύρημα ακολούθησαν και άλλες μελέτες που οδήγησαν στην απομόνωση στελεχών όπως τα *Cupriavidus* sp. DT-1 (70) και *Alcaligenes* sp. JAS1 (71) είχαν την ικανότητα να αποδομούν πλήρως οργανοφωσφορικά γ.φ.. Βακτηριακά στελέχη που έχουν την ικανότητα να αποδομούν τα περισσότερα οργανοφωσφορικά νηματοδωκτόνα που χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα όπως τα ethoprofos, casudafos και fenamiphos έχουν απομονωθεί. Δύο βακτηριακά στελέχη *Pseudomonas putida* (ερ I και erII) απομονωθηκαν απο εδάφη στην Ελλάδα με την ικανότητα να μεταβολίζουν υψηλές συγκεντρώσεις του ethoprofos (72). Μάλιστα διατήρησαν την αποδομητική τους ικανότητα σε υγρές καλλιέργειες και σε μεγάλο εύρος pH και θερμοκρασιών (73). Σε άλλες δύο μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν πάλι σε εδάφη απο καλλιέργειες πατάτας στην Ελλάδα, απομονωθηκαν, στην πρώτη, δύο αμιγείς καλλιέργειες που ταυτοποιήθηκαν ως *Sphigomonas* sp. και *Flavobacterium* sp. με την ικανότητα ταχύτατης αποδόμησης του cadusafos (58). Μάλιστα η συγκεκριμένη μελέτη ήταν και η πρώτη αναφορά απομόνωσης μικροοργανισμών που αποδομούν ταχύτατα το συγκεκριμένο νηματοδωκτόνο. Στη δεύτερη μελέτη απομονώθηκαν βακτήρια των ειδών *Pseudomonas putida* και το *Acinetobacter rhizosphaerae* με την ικανότητα να αποδομούν το νηματοδωκτόνο fenamiphos (57). Και τα δύο είχαν την ικανότητα να υδρολύουν το fenamiphos σε fenamiphos phenol ενώ το στέλεχος *P. putida* είχε την ικανότητα να μεταβολίζει παραιτέρω και το fenamiphos phenol. Τέλος σε άλλη μελέτη σε εδάφη από την Αυστραλία, απομονώθηκε το στέλεχος *Microbacterium esteraromaticum* με την ικανότητα αποδόμησης του fenamiphos αλλά και των τοξικών προϊόντων της οξειδωσης του, fenamiphos sulfoxide και fenamiphos sulfone (56) .

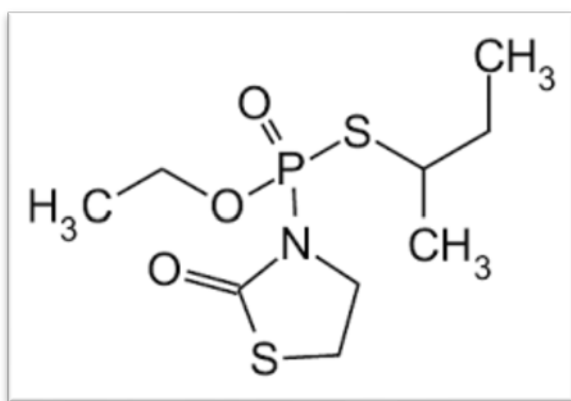
Σε πολλές περιπτώσεις η διαδικασία εμπλουτισμού οδήγησε στην απομόνωση μεικτών βακτηριακών καλλιεργιών με ικανότητα αποδόμησης διάφορων οργανοφωσφορικών γ.φ.. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρώτη βακτηριακή κοινοπραξία που απομονώθηκε και ήταν σε θέση να αποδομεί το fenamiphos και η οποία αποτελούνταν απο έξι διαφορετικά βακτήρια (74). Ακολούθως απομονώθηκαν άλλες δύο βακτηριακές κοινοπραξίες που αποτελούνταν απο πέντε και τέσσερα στελέχη αντίστοιχα και ήταν υπεύθυνες για την αποδόμηση του fenamiphos, χρησιμοποιώντας το ως μοναδική πηγή C και N (42).

1.5 Fosthiazate

Το fosthiazate (3-[butan-2-ylsulfanyl(ethoxy)phosphoryl]-1,3-thiazolidin-2-one) είναι ένα οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο. Ανήκει στην φωσφοροθειοϊκή (ονομάζεται επίσης και θειοφωσφορικό) ομάδα, που περιλαμβάνει οργανοφωσφορικές ενώσεις που περιέχουν την δομή P=S. Ο χημικός τύπος του Fosthiazate δίνεται στην Εικόνα 4. Χρησιμοποιείται στην γεωργική πρακτική σε σκευάσματα με μορφή κόκκων και υγρών γαλακτωμάτων, με το εμπορικό όνομα Nemathorin®. Η δράση του σε οργανισμούς-στόχους δηλαδή έντομα και νηματώδεις προκαλεί παρόμοιες επιδράσεις με τα άλλα οργανοφωσφορικά γ.φ. δρώντας στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων αναστέλλοντας την λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης. Δεν θεωρείται επιβλαβές για τον άνθρωπο εφόσον χρησιμοποιείται σύμφωνα με την εγκεκριμένη γεωργική πρακτική. Επίσης δεν έχει σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον, ωστόσο παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα για τα πουλιά αλλά και κατά την απελευθέρωση του σε υδάτινα οικοσυστήματα κυρίως σε ασπόνδυλα του γλυκού νερού (76).

Στην Ε.Ε. το Fosthiazate έχει εγκριθεί για χρήση ως νηματωδοκτόνο από το 2004 ενώ από το 2011 έχει εγκριθεί η χρήση του και ως εντομοκτόνο. Στην Ελλάδα και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες χρησιμοποιείται κυρίως για την καταπολέμηση των ριζόκομβων νηματωδών (*Meloidogyne spp.*) σε καλλιέργειες θερμοκηπίου, όπως επίσης και των κυστογόνων νηματωδών της πατάτας (*Globodera rostochiensis* και *Globodera pallida*). Επίσης στα πλαίσια των εντομοκτόνων ιδιοτήτων του, το Fosthiazate ελαττώνει την προσβολή των βολβών της πατάτας από σιδηροσκώληκες (*Agriotes spp.*). Πέρα από τις πατατοκαλλιέργειες, το Fosthiazate είναι αρκετά αποτελεσματικό στην καταπολέμηση των νηματωδών και σε άλλες καλλιέργειες (ντομάτα, καπνός, αγγούρι).

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, το Fosthiazate σε κανονικές συνθήκες (25°C, 1 atm) βρίσκεται σε υγρή κατάσταση έχοντας ένα ελαφρύ κίτρινο χρώμα και σημείο βρασμού τους 198°C. Η σχετική του πυκνότητα είναι 1.234 kg/m³. Η διαλυτότητα του στο νερό είναι 9.85 g/L και στο εξάνιο 15,14 g/L. Είναι επίσης διαλυτό σε μέθυλο-2-πυρολιδινόνη (NMP), ισοπροπυλική αλκοόλη και ξυλένιο. Τέλος έχει μεγάλη υδρολυτική σταθερότητα (DT₅₀) σε pH 5 (163-191 days) και 7 (102-107 days) ενώ υδρολύεται ταχύτατα σε pH 9 (3.2 - 3.3 days).



Εικόνα 4 Ο χημικός τύπος του fosthiazate

1.5.1 Περιβαλλοντική τύχη του fosthiazate

Παρά το γεγονός ότι πολλές πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την αποτελεσματικότητα του fosthiazate, λίγες μόνο μελέτες μέχρι τώρα έχουν εξετάσει την αποδόμηση και την προσρόφηση του στο έδαφος. Το Fosthiazate είναι ένα μετρίως υπολειμματικό νηματωδοκτόνο με τις τιμές DT_{50} στο έδαφος σε συνθήκες εργαστηρίου να κυμαίνονται από 18-60 ημέρες (**77, 78**). Περαιτέρω μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι το pH του εδάφους επηρεάζει σημαντικά την αποδόμηση του Fosthiazate με μεγαλύτερη υπολειμματικότητα να παρατηρείται σε όξινα εδάφη ($pH < 6$) (**78**). Η αυξημένη αποδόμηση του fosthiazate σε αλκαλικά εδάφη είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των οργανοφωσφορικών νηματωδοκτόνων. Αυτό οφείλεται τόσο στην αυξημένη μικροβιακή δραστηριότητα σε αλκαλικά εδάφη (**79**) όσο και στην ευπάθεια του φωσφοεστερικού δεσμού σε αλκαλικό περιβάλλον (**80**).

Το fosthiazate παρουσιάζει γενικά χαμηλή προσρόφηση στο έδαφος όπως υποδεικνύεται από τις χαμηλές τιμές των συντελεστών προσρόφησης K_f που κυμαίνονται από 0,45 έως 1,18 ml/g (**77**). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (**78**), όπου επιπλέον υποδεικνύεται ότι η προσρόφηση του fosthiazate ελέγχεται κυρίως από την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ουσία. Η μειωμένη προσρόφηση του fosthiazate στο έδαφος σε συνδυασμό με την αυξημένη υπολειμματικότητα του σε εδάφη με όξινο pH (**77**) υποδηλώνει αυξημένη πιθανότητα έκπλυσης στα βαθύτερα στρώματα του εδάφους και ρύπανσης των υπόγειων υδάτων, σε εδάφη «ευάλωτα» στην έκπλυση. Σε αυτό συνηγούνται μελέτες που εξέτασαν την πιθανότητα έκπλυσης του fosthiazate με τη χρήση τόσο μαθηματικών μοντέλων όσο και της εξίσωσης του Gustafson (**77, 78**). Τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων με μαθηματικά μοντέλα επιβεβαιώθηκαν σε μεγάλο βαθμό και από τους Karpouzas *et al.* (**80**) σε πειράματα στήλης έκπλυσης. Επομένως η χρήση του fosthiazate σε εδάφη που χαρακτηρίζονται από χαμηλό pH και χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία θα πρέπει να πραγματοποιείται με

προσοχή λόγω του υψηλού κινδύνου έκπλυσης και ρύπανσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα .

Όσον αφορά την μικροβιακή αποδόμηση του fosthiazate λίγα στοιχεία είναι διαθέσιμα σε αντίθεση με τα περισσότερα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και νηματωδοκτόνα των οποίων έχει αναλυθεί ο μηχανισμός μικροβιακής αποδόμησης τους και οι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί έχουν μελετηθεί εκτεταμένα (41). Σε μελέτη προκειμένου να εξετασθεί η ευπάθεια του fosthiazate στην επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση σε εδάφη από καλλιέργειες πατάτας στο Ηνωμένο Βασίλειο, τα αποτελέσματα δεν έδειξαν την ύπαρξη τέτοιου φαινομένου (81). Σύμφωνα με τους συγγραφείς η απουσία εμφάνισης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης για το fosthiazate είναι πιθανό να σχετίζεται με την πρόσφατη εισαγωγή του νηματωδοκτόνου στο Η.Β. και επομένως την έλλειψη εδαφών με πολυετές ιστορικό χρήσης . Σε άλλη μελέτη (82) βακτήρια που είχαν την ικανότητα ταχύτατης αποδόμησης του fenamiphos δεν είχαν την ικανότητα να αποδομούν και το fosthiazate. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες από τους Παπαδοπούλου *et al.* (83) έδειξαν ότι σε εδάφη καλλιέργειας πατάτας από το Νευροκόπι Δράμας με χρόνια έκθεση στο fosthiazate παρατηρήθηκε επιταχυνόμενη βιολογική αποδόμηση.

1.6 Σκοπός του πειράματος

Σήμερα, στο πλαίσιο της Ε.Ε. είναι διαθέσιμος περιορισμένος αριθμός γεωρικών φαρμάκων για την καταπολέμηση των εδαφογενών εχθρών της πατάτας. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πατάτα καλλιεργείται ως μονοκαλλιέργεια δεν επιτρέπει την εναλλαγή αγροχημικών σκευασμάτων στο έδαφος, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο για τη μείωση της αποτελεσματικότητας των γεωργικών φαρμάκων λόγω μικροβιακής προσαρμογής .

Σε προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος παρατηρήθηκε το φαινόμενο της **επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης** του οργανοφωσφορικού νηματοδοκτόνου fosthiazate (83). Βασικός στόχος της παρούσας διατριβής ήταν , σε συνέχεια των προηγούμενων μελετών , η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μικροοργανισμών από το συγκεκριμένο έδαφος που είναι υπεύθυνοι για την ταχύτατη αποδόμηση του fosthiazate στο συγκεκριμένο έδαφος.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα εδαφών

Το δείγμα εδάφους (Νευροκόπι 3) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μικροοργανισμών συλλέχθηκε από αγρό, στον οποίο καλλιεργούνταν πατάτα, από το Νευροκόπι Δράμας. Ο συγκεκριμένος αγρός είχε δεχθεί επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του νηματοδοκτόνου *fosthiazate*. Πιο συγκεκριμένα από το 2009 έως και το 2013 (με εξαίρεση το 2010) ο παραγωγός εφάρμοζε 4 Kg/στρέμα *Nemathorin*[®]. Το 2013 ο παραγωγός παρατήρησε μειωμένη αποτελεσματικότητα του σκευάσματος.

2.2 Γεωργικά φάρμακα

Για την προετοιμασία των θρεπτικών μέσων αλλά και για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολοίπων του *fosthiazate* στα θρεπτικά μέσα χρησιμοποιήθηκαν η πρότυπη ουσία *fosthiazate* (99%, Sigma-Aldrich, USA) όπως και το εμπορικό σκεύασμα *Nemathorin*[®], 150EC (15% v/v). Από την πρότυπη ουσία παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης **500 mg L⁻¹** και από το εμπορικό σκεύασμα υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης **4.000 mg L⁻¹**.

2.3 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Για την απομόνωση των βακτηρίων του εδάφους χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων (MSM, mineral salts medium) αλλά και εμπλουτισμένο με άζωτο (MSMN) έτσι ώστε το *fosthiazate* να αποτελεί την μοναδική πηγή C και N ή C αντίστοιχα. Για να εξεταστεί η αποδομητική ικανότητα των απομονωμένων αποικιών χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον τα θρεπτικά μέσα, Mandelbaum+Μίγμα αμινοξέων και LB (Luria Bertani). Όλες οι προεργασίες πραγματοποιήθηκαν ασηπτικά σε θάλαμο νηματικής ροής και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 λεπτά. Η αποστείρωση των θερμικά ευαίσθητων υδατικών διαλυμάτων που περιείχαν το γεωργικό φάρμακο, όπως και άλλων θερμοευαίσθητων διαλυμάτων, απαραίτητων για την παρασκευή των παραπάνω θρεπτικών μέσων, πραγματοποιήθηκε μέσω διήθησης από ειδικά φίλτρα σύριγγας (Q-Max[®] syringe filters, w/0.22 µm Polyethersulfone (PES) membranes).

2.3.1 Παρασκευή θρεπτικών μέσων MSMN και MSM

Το θρεπτικό μέσο MSMN περιείχε εκτός από C, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μικροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N). Αυτό έγινε ώστε το fosthiazate να αποτελεί τη μοναδική πηγή C για τα αναπτυσσόμενα βακτήρια. Το θρεπτικό αυτό μέσο παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (stock) ανόργανων αλάτων, τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες ώστε να δώσουν το τελικό MSMN (Πίνακας 1).

Τα Stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 1 L απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 λεπτά. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση επειδή ο FeSO_4 είναι θερμοευαίσθητος. Για την προετοιμασία 1 L MSMN, 100 ml από το Stock 1 διαλύθηκαν σε 780 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό (dH_2O) και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε τη θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν ασηπτικά 100 ml Stock 2 και 20 ml Stock 3.

- ❖ Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου MSMN προστέθηκαν στα 780 ml dH_2O +100 ml Stock 1, 15 g άγαρ (1,5%) και στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία όπως αναφέρεται παραπάνω και η επίστρωση των τρυβλίων

Πίνακας 1. Συστατικά των Stock διαλυμάτων αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου MSMN.

	Συστατικά	g/L
Stock 1	KH_2PO_4	22,7
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	59,7
	NH_4Cl	10,0
Stock 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2
Stock 3	FeSO_4	0,25

- ❖ Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου MSM ακολούθηθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με μοναδική διαφορά ότι το Stock 1 (Πίνακας 1) περιείχε NaCl αντί του NH_4Cl έτσι ώστε το fosthiazate να αποτελεί τη μοναδική πηγή τόσο C όσο και N.

2.3.2 Παρασκευή θρεπτικού μέσου Mandelbaum + Μίγμα αμινοξέων

Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο περιείχε εκτός από C όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μικροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N). Επιπλέον περιείχε βιταμίνες και όλα τα αμινοξέα έτσι ώστε να ενισχυθεί η ικανότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Το θρεπτικό μέσο παρασκευάστηκε από δυό διαλύματα (Stock αλάτων και Stock βιταμινών) τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες με απεσταγμένο νερό(dH₂O) στο οποίο είχαν προστεθεί άλατα και το μίγμα αμινοξέων ώστε να δώσουν το θρεπτικό μέσο Mandelbaum (Πίνακας 2).

Για την παρασκευή 1L θρεπτικού μέσου τα άλατα που περιγράφονται στον Πίνακα 2 και το μίγμα αμινοξέων προστέθηκαν σε 960 ml dH₂O, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7.3 και ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 λεπτά. Τα Stock αλάτων και βιταμινών αποστειρώθηκαν με διήθηση μέσω φίλτρου σύριγγας. Στη συνέχεια υπό ασηπτικές συνθήκες 20 ml από κάθε stock προστέθηκαν στα 960 ml dH₂O όταν είχε φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Πίνακας 2. Συστατικά του θρεπτικού μέσου Mandelbaum.

	Συστατικά	g/L
960 mL dH₂O	K ₂ HPO ₄	1,6
	KH ₂ PO ₄	1,4
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
	NaCl	0,1
	CaCl ₂	0,02
	Casamino acids	0,15
Stock διάλυμα βιταμινών	Thiamine-HCl	0,005
	Biotin	0,002
	Folic acid	0,002
	Nicotinamide	0,010
	Pyridoxine-HCl	0,010
Stock διάλυμα αλάτων	EDTA	2,5
	ZnSO ₄	11,1
	FeSO ₄	5,0
	MnSO ₄ .H ₂ O	1,54
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,4
	Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0,25
	Na ₂ B ₄ O ₇ . 10H ₂ O	0,18
	H ₂ SO ₄	5

2.3.3 Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (Luria Bertani)

Για την παρασκευή 1 L θρεπτικού μέσου LB, 10 g NaCl, 10 g καζεΐνης και 5 g εκχυλίσματος ζύμης αραιώθηκαν σε 1 L dH₂O, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα και στη συνέχεια αποστειρώθηκαν στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 λεπτά. Για την παρασκευή 1 L στερεού θρεπτικού μέσου LB προστέθηκαν 15 g άγαρ (1,5%) προτού πραγματοποιηθεί η αποστείρωση. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν τα τρυβλία. Για την παρασκευή LB μέσου για τη διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων, προστέθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες 1 mL αμπικιλίνης από υδατικό διάλυμα stock (100 mg/ml).

Για την παρασκευή όλων των θρεπτικών μέσων που περιγράφηκαν παραπάνω τα οποία περιείχαν fosthiazate σε συγκεντρώσεις 20, 50, 100 και 500 mg/L χρησιμοποιήθηκαν τα υδατικά διαλύματα του νηματωδοκτόνου (Ενότητα 2.2). Η προσθήκη των υδατικών διαλυμάτων του γ.φ. πραγματοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες και αφού τα διαλύματα βρίσκονταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2.4 Μέθοδος ανάλυσης fosthiazate

Για την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων του fosthiazate στις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC Marathon III, που ήταν εξοπλισμένο με σύστημα αντλιών βαθμιδωτής έκλουσης, όγκο έγχυσης 20 µL και ανιχνευτή UV, ενώ ήταν συνδεδεμένο με το ανάλογο λογισμικό clarity® για την παραλαβή και επεξεργασία των δεδομένων. Ο διαχωρισμός του fosthiazate έγινε σε στήλη CNW Athena RP C18 150 mm× 4.6mm column (CNW Technologies, Düsseldorf, Germany) με ισοκρατική έκλουση και κινητή φάση ACN:H₂O (HPLC Grade/Merck GmbH, Germany) σε ογκομετρική αναλογία 60:40 και ροή 1 ml min⁻¹. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 230 nm και ο χρόνος κατακράτησης του fosthiazate ήταν 3,6 min.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα εδάφους ήταν απαραίτητη η κατασκευή και η χρήση πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα fosthiazate 1000 µg/ml σε μεθανόλη (HPLC Grade/Merck GmbH, Germany). Ακολουθώντας, από τα αρχικά πρότυπα διαλύματα με κατάλληλες αραιώσεις προετοιμάστηκε σειρά διαλυμάτων συγκεντρώσεων από 0.01 ως 10 µg/ml σε μεθανόλη. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του γεωργικού φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού clarity®

2.5 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate

2.5.1 Προεπεξεργασία του εδάφους

Για να ενεργοποιηθεί η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και να μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες απομόνωσης αποδομητικών βακτηρίων προτού ξεκινήσει η διαδικασία εμπλουτισμού προηγήθηκε εκ νέου εφαρμογή του fosthiazate στο έδαφος. Σε 120 g εδάφους έγινε εφαρμογή υδατικού διαλύματος του fosthiazate (40 mg/L) ώστε η τελική συγκέντρωση στο έδαφος να είναι 2 μg/g (μέγιστη συνιστώμενη δόση). Αφού η υγρασία προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας του εδάφους τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C στο σκοτάδι. Στις σακούλες δημιουργήθηκε οπή ώστε να διατηρηθούν οι αερόβιες συνθήκες. Δειγματοληψία ακολούθησε αμέσως μετά την εφαρμογή (t0 ημέρες) και μία εβδομάδα μετά (t7 ημέρες). Ακολούθησε η εκχύλιση των υπολειμάτων του fosthiazate σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης QUECHERS (84) που περιγράφεται από τους Papadopoulos *et al.* (83) και ανάλυση τους στο σύστημα HPLC Marathon III. Την πρώτη εφαρμογή ακολούθησε και δεύτερη εφαρμογή με δειγματοληψίες αυτή τη φορά αμέσως μετά την εφαρμογή, 3, 4 κι 5 ημέρες αργότερα.

2.5.2 Εμπλουτισμός καλλιιεργιών

Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων διαδοχικών εφαρμογών του fosthiazate στο έδαφος 0,5 g εδάφους χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό θρεπτικών μέσων MSM και MSMN + fosthiazate (20 mg/L). Υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε θρεπτικό μέσο καθώς και από δύο επαναλήψεις για κάθε θρεπτικό μέσο οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν και οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C υπό ανάδευση 160 στροφών/min. Πρίν τον εμβολιασμό (0 ημέρες) και στη συνέχεια σε καθορισμένους χρόνους συλλέχθηκαν δείγματα (0,5 mL) από όλες τις υγρές καλλιέργειες και αναλύθηκαν ώστε να μελετηθεί η αποδόμηση του fosthiazate. Η εκχύλιση των υπολειμάτων του fosthiazate πραγματοποιήθηκε με της εξής διαδικασία:

1. 0,5 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνες Eppendorf (1,5 mL)
2. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο για 5 min σε μέγιστη ταχύτητα
3. Ακολούθησε προσεκτικά λήψη του υπερκείμενου και μεταφορά σε νέους σωλήνες Eppendorf (1,5 mL)
4. Προστέθηκε ίσος όγκος MeOH (0,5 mL) και ακολούθησε σύντομη ανάδευση σε vortex
5. Τα δείγματα στη συνέχεια αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω.

Όταν το ποσοστό αποδόμησης ξεπέρασε το 80% προετοιμάστηκε ο 2^{ος} κύκλος ανακαλλιέργειας. Συγκεκριμένα 0,5 mL από τις καλλιέργειες μεταφέρθηκε σε νέα

σειρά θρεπτικών μέσων. Η ίδια διαδικασία ανακαλλιέργειας και εμπλουτισμού επαναλήφθηκε συνολικά για έξι κύκλους σε MSMN+fosthiazate(20 mg/L) και για τρεις μόνο κύκλους στο MSMN+fosthiazate(20 mg/L) λόγω περιορισμένης αποδόμησης του fosthiazate. Κατά τους τελευταίους κυκλους ανακαλλιέργειών 0,7 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε σωλήνες errendorf (1,5 mL) όπου αναμίχθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα γλυκερόλης 50% και διατηρήθηκαν στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

2.5.3 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate

Όταν η αποδόμηση του fosthiazate στον τελευταίο κύκλο ανακαλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο MSMN ξεπέρασε το 90% προετοιμάστηκε σειρά διαδοχικών αραιώσεων (10^{-1} – 10^{-6}). Στη συνέχεια από τις τρεις μεγαλύτερες αραιώσεις (10^{-4} , 10^{-5} και 10^{-6}) επιστρώθηκαν 0,2 mL σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό MSMN+fosthiazate (20 mg/L). Τα τρυβλία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για επώαση στους 26°C. Ύστερα από δύο ημέρες ικανοποιητικός αριθμός αποικιών είχε αναπτυχθεί. Ακολούθησε επιλογή αποικιών, με τη βοήθεια αποστειρωμένων ακίδων υπό ασηπτικές συνθήκες, με βάση δύο κριτήρια (1) μορφολογικά χαρακτηριστικά και (2)όσο το δυνατόν καλύτερος διαχωρισμός από παρακείμενες αποικίες ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα απομόνωσης μη αξενικών αποικιών. Τελικά επιλέχθηκαν συνολικά 40 αποικίες οι οποίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια των 30 mL με πώμα που περιείχαν 5 mL θρεπτικού μέσου MSMN+Fosthiazate. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης με θερμοκρασία 25°C και υπό ανάδευση 160 στροφών/min. Δείγματα θρεπτικού μέσου (0,5 mL) συλλέχθηκαν στις 0, 7 και 14 ημέρες. Παράλληλα τοποθετήθηκε για επώαση και ένα δείγμα MSMN+Fosthiazate που δεν εμβολιάστηκε με βακτήρια και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Σε καμία από τις επιλεγμένες καλλιέργειες δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση του fosthiazate.

Ακολούθησε στη συνέχεια δεύτερη προσπάθεια απομόνωσης βακτηρίων. Έτσι πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός νέων καλλιεργειών MSMN+fosthiazate (20mg/L) από stock γλυκερόλης (50 µL) που συλλέχθηκε με την ολοκλήρωση του δεύτερου κύκλου εμπλουτισμού. Ειδικότερα εμβολιάστηκαν καλλιέργειες MSMN που είχαν προετοιμαστεί είτε με προσθήκη πρότυπης αναλυτικής ουσίας (MSMN+A) είτε με προσθήκη σκευάσματος fosthiazate (MSMN+F). Αυτό έγινε προκειμένου να μελετηθεί αν διαφοροποιείται η αποδομητική ικανότητα των βακτηρίων ανάλογα με την πηγή του fosthiazate. Για κάθε θρεπτικό υπήρχαν τρεις επαναλήψεις και δύο μάρτυρες. Ακολούθησε παρακολούθηση της αποδόμησης του fosthiazate και σειρά ανακαλλιέργειών όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

Στη συνέχεια, αφού παρατηρήθηκε αποδόμηση 90% στον δεύτερο κύκλο ανακαλλιέργειας, ακολούθησε επίστρωση (από τις καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο

MSMN+A) σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο MSMN+A και σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB+A. Από κάθε θρεπτικό επιλέχθηκαν 20 αποικίες, αρα συνολικά 40, οι οποίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια των 30 mL με βιδωτό καπάκι που περιείχαν 5 ml του αντιστοιχού θρεπτικού μέσου. Επιπλέον υπήρχαν δύο καλλιέργειες μάρτυρες, μία για κάθε θρεπτικό. Δειγματοληψία έγινε στις 0, 7 και 14 ημέρες. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται και παραπάνω. Καλλιέργειες στις οποίες παρατηρήθηκε αποδόμηση >80% της αρχικής συγκέντρωσης του fosthiazate θεωρήθηκαν ως θετικές και μελετήθηκαν περαιτέρω. Η αμιγότητα των καλλιεργειών ελέγχθηκε προκαταρκτικά με επίστρωση σε τρυβλία LB και ακολούθως με μοριακή αποτύπωση με τη μέθοδο DGGE όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.6 Μοριακή ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων

2.6.1 Εξαγωγή DNA

Υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων, που επιλέχθηκαν ως θετικές για την αποδόμηση του fosthiazate χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή DNA η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού kit Nucleospin® Tissue (Marcherey–Nagel, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η ποιότητα του εξαγόμενου DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0,7%.

2.6.2 PCR ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου

Στην αντίδραση της PCR ενισχύθηκε το 16S rRNA γονίδιο (1500 bp) με το ζεύγος εκκινητών 8f & 1512r (85). Οι αλληλουχίες των εκκινητών, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται στους Πίνακες 3, 4 και 5. Η ποιότητα και το μέγεθος των PCR προϊόντων ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%.

Πίνακας 3. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων που απομονώθηκαν.

Εκκινητές	Αλληλουχία	Tm ⁰ C
8f	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'	52
1512r	5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA - 3'	52

Πίνακας 4. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων (1 δείγμα).

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	2,5	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTPs	0,5	0,2 μM
Forward Primer 8f (20 pmol/L)	0,5	0,2 μM
Reverse Primer 1512r (20 pmol/L)	0,5	0,2 μM
Kapa Taq Polymerase (1 U/μL)	0,1	1 U/25 μL
dd H ₂ O	19,9	-
DNA (sample)	1	10-50 ng
total	25	-

Πίνακας 5. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR με τους εκκινητές 8f-1512r.

Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη	95°C	1 min	30 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55 °C	1 min	
Επιμήκυνση	72 °C	2 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	

Η αμιγότητα των βακτηριακών καλλιεργειών ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) με προϊόντα PCR που προέκυψαν ύστερα από PCR εσωτερικής ένθεσης στο γονίδιο 16S rRNA. Πιο συγκεκριμένα τα προϊόντα που προέκυψαν από την αρχική PCR με τους εκκινητές 8f - 1512r χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα σε PCR εσωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές *MuzyerF* (357f+GC) και *MuzyerR* (534r) (86) και μέγεθος προϊόντος αντίδρασης 194 bp. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Το πρόσθιο εκκινητικό μόριο έχει στο 5' άκρο του μία ακολουθία 40 βάσεων εμπλουτισμένη σε G+C που αποτρέπει την πλήρη αποδιάταξη του προϊόντος κατά την ηλεκτροφόρηση του σε σύστημα DGGE. Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι ίδιες με αυτές που περιγράφονται στον Πίνακα 5 με μοναδική διαφορά στον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης (25 κύκλοι αντί για 30) . Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια πλην των εκκινητών είναι επίσης ίδια με αυτά που περιγράφονται στον Πίνακα 4. Το μέγεθος των PCR προϊόντων ελέγχθηκε με ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,2%.

Πίνακας 6. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος DNA (από προϊόν PCR με το ζεύγος εκκινητών 8f-1512r) μέσω PCR εσωτερικής ένδεσης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την μοριακή αποτύπωση των απομονωθέντων βακτηρίων με την μέθοδο DGGE.

Εκκινητές	Αλληλουχία	Tm°C
MuyzerF (357f-GC)	5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GGG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3'	103,2
MuyzerR (534r)	5'- ATT ACC GCG GCT GCT GGG – 3'	54,4

2.6.3 Μοριακή αποτύπωση DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) των βακτηριακών καλλιεργειών

Η μέθοδος μοριακής αποτύπωσης DGGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό δίκλωνων τμημάτων DNA που έχουν το ίδιο μέγεθος αλλά διαφορετική αλληλουχία τα οποία ηλεκτροφορούνται σε πηκτή ακρυλαμίδης που περιέχει αποδιατακτικές ουσίες με αυξανόμενη διαβάθμιση κατα μήκος της πηκτής. Γενικότερα τμήματα DNA που παρουσιάζουν στην αλληλουχία τους υψηλό ποσοστό GC αποδιατάσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις αποδιατακτικών ουσιών. Με αυτόν το τρόπο η DGGE μπορεί να διαχωρήσει τμήματα DNA που διαφέρουν ακόμα και σε μία βάση.

Υλικά και διαλύματα

- Πλήρες σύστημα DGGE (INGENY® phorU-2x2)
- Αντλία ανάμιξης διαλυμάτων αποδιατακτικών ουσιών
- Ακρυλλαμίδη (Acrylamide-Bisacrylamide 40% solution 37.5:1)
- Φορμαμίδη (Deinized Formide)
- Ουρία
- TEMED (N,N,N',N'- tetramethylenediamine)
- 10% Ammonium Persulphate Solution (APS, 100mg σε 1 mL ddH₂O)
- 50x TAE

Πίνακας 7. Διαλύματα 0% και 100% αποδιατακτικών ουσιών

Αντιδραστήρια	0%	100%
Ακρυλαμίδη	20 mL	20 mL
Φορμαμίδη	-	40 mL
Ουρία	-	42 g
50x TAE	2 mL	2 mL
dH ₂ O	Στα 100 mL	Στα 100 mL

Για την εφαρμογή της μεθόδου DGGE χρησιμοποιήθηκε το σύστημα INGENY® phorU-2x2 (Εικόνα 5). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 8% (w/v) με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών που κυμάνθηκε από 45-65%. Στην πηκτή φορτώθηκε 1 μ L του προϊόντος που προέκυψε από την PCR εσωτερικής ένθεσης και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 16 ωρών στα 75 V.



Εικόνα 5 Σύστημα INGENY® phorU-2x2 που χρησιμοποιήθηκε για την μοριακή αποτύπωση των βακτηριακών καλλιεργειών με την μέθοδο DGGE

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολούθησε η βαφή της πηκτής, με τα διαλύματα που περιγράφονται στον Πίνακα 8, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Η πηκτή ξεπλύθηκε ελαφρώς με νερό
- Τοποθετήθηκε σε πλαστικό δοχείο που πειείχε 500 mL Fixing Solution I
- Ακολούθησε ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 2 h
- Απομακρύνθηκε το Fixing Solution I, η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό και προστέθηκαν στο ίδιο δοχείο 500 mL Staining Solution
- Ακολούθησε ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα για 20 min
- Απομακρύνθηκε το Staining Solution στη βρύση με ροή νερού, η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό και προστέθηκαν 500 mL Developing Solution
- Ακολούθησε ανακίνηση σε περιστροφικό αναδευτήρα μέχρι να αρχίσουν να φαίνονται οι ζώνες DNA στην πηκτή
- Όταν ολοκληρώθηκε η εμφάνιση των ζωνών, απομακρύνθηκε το Developing Solution στη βρύση με ροή νερού και η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό
- Τέλος, ακολούθησε η φωτογράφιση της πηκτής

Πίνακας 8. Διαλύματα για την βαφή της πηκτής ακρυλαμίδης

Διαλύματα	Συστατικά
Fixing Solution I	10 % αιθανόλη 0,5 % οξικό οξύ
Staining Solution	1 g AgNO ₃ σε 1 L dH ₂ O
Developing Solution	0,1 g NaBH ₄ 1 L NaOH 1,5 % 4 mL φορμαλδεύδη

2.6.4 Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Μετά την DGGE, **τρεις** από τις τέσσερις αποικίες επιλέχθηκαν για να μελετηθούν περαιτέρω. Τα προϊόντα PCR (1500 bp) καθαρίστηκαν με το εμπορικό kit Nucleospin® Gel and PCR clean – up (Marcherey – Nagel, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Με τη διαδικασία του καθαρισμού γίνεται αποτελεσματική απομάκρυνση της περίσσειας εκκινητών, dNTPs, αλάτων, και ενζύμων που παραμένουν με την ολοκλήρωση της PCR.

2.6.5 Ένθεση σε πλασμιδιακούς φορείς

Μετά τη διαδικασία καθαρίσμου ακολούθησε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση του Qubit® 2.0 Fluometer. Με βάση τις τιμές απορρόφησης και βάση του τύπου $[25 \text{ ng φορέας} \times \gamma \text{ kb DNA sample} / 3 \text{ kb}] \times (3/1)$, όπου γ το μέγεθος του προϊόντος της PCR (στην συγκεκριμένη περίπτωση 1,5 kb), υπολογίστηκαν τα μL DNA που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM®-T easy (Promega). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επώαστηκαν στους 4°C για 16 h

Πίνακας 9. Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση ένθεσης

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
2x Buffer	5
Πλασμιδιακός φορέας pGEM	0,5
PCR προϊόν	x
T4 λιγάση	1
ddH ₂ O	y
Συνολικός Όγκος	10 μL

2.6.6 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*

Με την ολοκλήρωση της ένθεσης ακολούθησε ο μετασχηματισμός των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* (DH5a competent cells, Invitrogen, USA). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη διαδικασία του μετασχηματισμού ήταν τα εξής:

1. Σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf (1,5 mL) τοποθετήθηκαν 80 μ L δεκτικών κυττάρων και 4 μ L ανασυνδιασμένων πλασμιδίων και ανακινήθηκαν ελαφρώς. Στη συνέχεια οι σωλήνες Eppendorf τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά στον πάγο.
2. Μετά τα 30 λεπτά παραμονής στον πάγο τα Eppendorfs μεταφέρθηκαν **αμέσως** για επώαση στους 42°C για 55 sec.
3. Μετά το heatshock τα Eppendorfs μεταφέρθηκαν **αμέσως** και πάλι στον πάγο για 2 λεπτά.
4. Μετά το πέρας των 2 λεπτών, προστέθηκαν υπό φλόγα 500 μ L (αποστειρώμενου) LB και στη συνέχεια τα δείγματα επώασταν για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 37°C.
5. Στη συνέχεια 250 μ L από κάθε δείγμα επιστρώθηκαν ασηπτικά, υπό φλόγα, σε τρυβλία με LB+αμπικιλίνη. Ακολούθησε προσθήκη και επιστροφή στα τρυβλία 40 μ L X GAL (2%) και 8 μ L IPTG.
6. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 16-20 ώρες.

2.6.7 Colony PCR και DGGE ανάλυση των επιλεγμένων αποικιών

Την επόμενη μέρα, αφού είχε γίνει επώαση των τρυβλίων, πραγματοποιήθηκε επιλογή λευκών αποικιών για κάθε βακτήριο (συνολικά 25 αποικίες) με τη χρήση αποστειρωμένων ακίδων υπό φλόγα. Οι ακίδες αφού πρώτα ανακινήθηκαν ελαφρώς μέσα σε σωληνάρια PCR, έτσι ώστε ένας μικρός αριθμός βακτηρίων να μεταφερθεί σε αυτά, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια (30 mL) με βιδωτό πώμα που περιείχαν LB+ αμπικιλίνη. Τα μπουκάλια με τις υγρές καλλιέργειες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με ανάδευση στους 37°C στις 210 στροφές/min για 16 h.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε colony PCR. Τα αντιδραστήρια και το ζεύγος εκκινητών (357f+GC & 534r) που χρησιμοποιήθηκαν στην colony PCR παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 6 αντίστοιχα, ενώ οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Τα προϊόντα της colony PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1,2% για την επιβεβαίωση της επιτυχούς ένθεσης. Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των επιλεγμένων προϊόντων σε σύστημα DGGE όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.6.3.

Πίνακας 10. Θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες colony-PCR

Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη	95°C	30 sec	30 κύκλοι
Υβριδοποίηση	55 °C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 min	

2.6.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση

Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τις αντίστοιχες καλλιέργειες σε LB+αμπικιλίνη. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit Nucleospin® Plasmid (Marcherey – Nagel, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση του Qubit® 2.0 Fluometer. Ετσι ώστε να ελεγχθεί ότι όλα τα δείγματα προς αλληλούχιση περιείχαν ποσότητα DNA 20-50 ng/μL και απέσταλσαν για αλληλούχιση στην εταιρεία CEMIA (www.cemia.eu). Οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις (χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών SP6-T7) ώστε να πάρουμε πλήρη αλληλουχία (1.500 bp) του 16S rRNA γονιδίου.

2.6.9 Ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηρίων και φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν συναρμολογήθηκαν ώστε να προκύψει ολόκληρη η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα **CAP3** (CONTIG ASSEMBLY PROGRAM Version 3, Unipro UGENE Online User Manual). Όσες αλληλουχίες πλήρους μήκους προέκυψαν, παρατέθηκαν στη βάση δεδομένων *16S rRNA sequences (bacteria and archaea) from the type strain collection* του NCBI και χρησιμοποιώντας το online εργαλείο **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) και πιο συγκεκριμένα το BLASTn (Standard Nucleotide BLAST). Στη συνέχεια οι προς ανάλυση αλληλουχίες μαζί με τις πιο σχετικές (με identity score >96%) αλληλουχίες που προέκυψαν από την ανάλυση με το εργαλείο BLASTn καθώς και τουλάχιστον μια «εξωτερική» αλληλουχία (με ταξινομική απόκλιση σε επίπεδο τουλάχιστον οικογένειας) χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Η διαδικασία αυτή έγινε χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Seaview® (Version 4.7) (87), ένα περιβάλλον εργασίας μέσω του οποίου είναι δυνατή η ευθυγράμμιση πολλαπλών αλληλουχιών. Πιο συγκεκριμένα με το πρόγραμμα **Muscle**

(88) πραγματοποιήθηκε η πολλαπλή στοίχιση των επιλεγμένων αλληλουχιών, με το πρόγραμμα **Gblocks v.0.91b** (89) αφαιρέθηκαν μη στοιχισμένα τμήματα και διατηρήθηκαν μόνο υψηλά συντηρημένα τμήματα, ενώ το φυλογενετικό δέντρο κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα **PhyML v3.1** (90).

2.7 Αξιολόγηση της ικανότητας των απομονωθέντων βακτηρίων να αποδομούν υψηλές συγκεντρώσεις του fosthiazate

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να μελετηθεί η ικανότητα αμιγών καλλιεργιών των απομονωθέντων βακτηρίων να αποδομούν υψηλές συγκεντρώσεις του fosthiazate σε υγρές καλλιέργειες. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η αποδομητική ικανότητα ενός εκ των βακτηρίων που απομονώθηκαν να αποδομεί το fosthiazate σε συγκεντρώσεις 20, 50, 100, και 500 mg/L σε θρεπτικό μέσο LB. Για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα fosthiazate (4.000 mg/L) που παρασκευάστηκε από το εμπορικό σκεύασμα (Ενότητα 2.2).

Αρχικά έγινε ανάκτηση βακτηρίων από το stock γλυκερόλης (50 μ L) του επιλεγμένου βακτηρίου και εμβολιασμός σε 10 mL θρεπτικό LB+fosthiazate 20mg/L. Όταν η αποδοόμηση του fosthiazate ξεπέρασε το 70%, η συγκεκριμένη καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε (0,5 mL) για τον εμβολιασμό νέων καλλιεργειών LB. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης υπήρχαν τρεις επαναλήψεις όπου εμβολιάστηκαν και δύο επαναλήψεις που δεν εμβολιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Όλες οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C υπό ανάδευση 160 στροφών/min. Δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε αμέσως πριν τον εμβολιασμό (0 ημέρες) και 4, 8, 11, 14, 21, και 28 ημέρες μετά. Τα δείγματα αφού εκχυλίστηκαν όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 2.5.2 αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC.

Για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής (DT_{50}) του Fosthiazate σε κάθε θρεπτικό χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα κινητικής που έχουν προταθεί από το FOCUS working group (91). Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό των DT_{50} χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single first order, SFO) και τρία μη γραμμικά μοντέλα κινητικής (Hockey Stick, Gustafson and Holden και Bi-exponential) (Πίνακας 11). Το στατιστικό πρόγραμμα R χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων των μοντέλων κινητικής και το σχεδιασμό των διαγραμμάτων. Γενικότερα, τα διφασικά μοντέλα κινητικής χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις περιπτώσεις στις οποίες το μοντέλο SFO δεν περιέγραφε με ικανοποιητική ακρίβεια ($\chi^2 > 15\%$) την κινητική αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων.

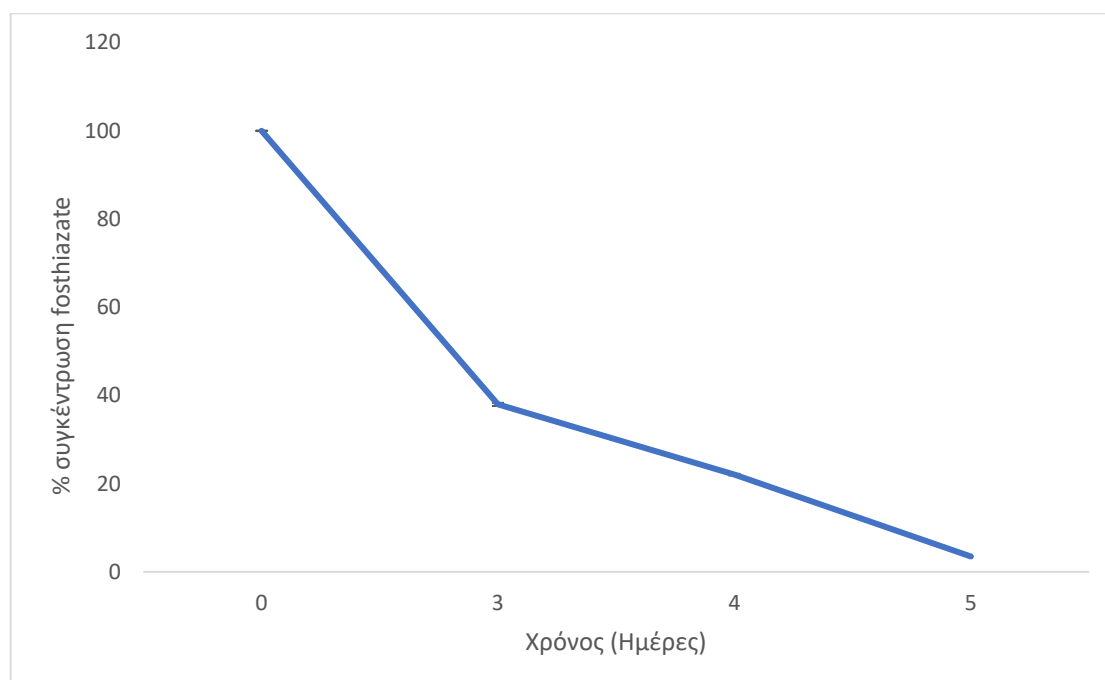
Πίνακας 11. Οι μαθηματικές εξισώσεις των μοντέλων κινητικής που χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν την αποδόμηση του *fosthiazate* και οι εξισώσεις υπολογισμού του χρόνου ημιζωής του για καθένα από τα μοντέλα.

Μοντέλο	Μαθηματική εξίσωση	Υπολογισμός Ημιζωής
Single first order (linear) (SFO)	$C = C_0 e^{-kt}$	$t_{1/2} = \ln 2 / K$
Gustafson and Holden (FOMC)	$C = C_0 e^{-K_1 t}$ for $t \leq t_b$	$t_{1/2} = \ln 2 / K_1$
Hockey Stick (HS)	$C = C_0 e^{-k_1 t} e^{-k_2 (t-t_b)}$ for $t > t_b$	$t_{1/2} = t_b + (\ln 2 - k_1 t_b) / k_2$
Bi-exponential (DFOP)	$C = C_0 (g e^{-k_1 t} + (1-g) e^{-k_2 t})$	Iterative method

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ένεργοποίηση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους

Στο Διάγραμμα 3.1 παρουσιάζεται η αποδόμηση του fosthiazate στο έδαφος έπειτα από την 2^η εφάρμογή του γ.φ. στο επιλεγμένο έδαφος προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους για την αποδόμηση του fosthiazate. Γενικά παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα υψηλοί ρυθμοί αποδόμησης του fosthiazate με περισσότερο από 90% αποδόμηση εντός 5 ημερών.

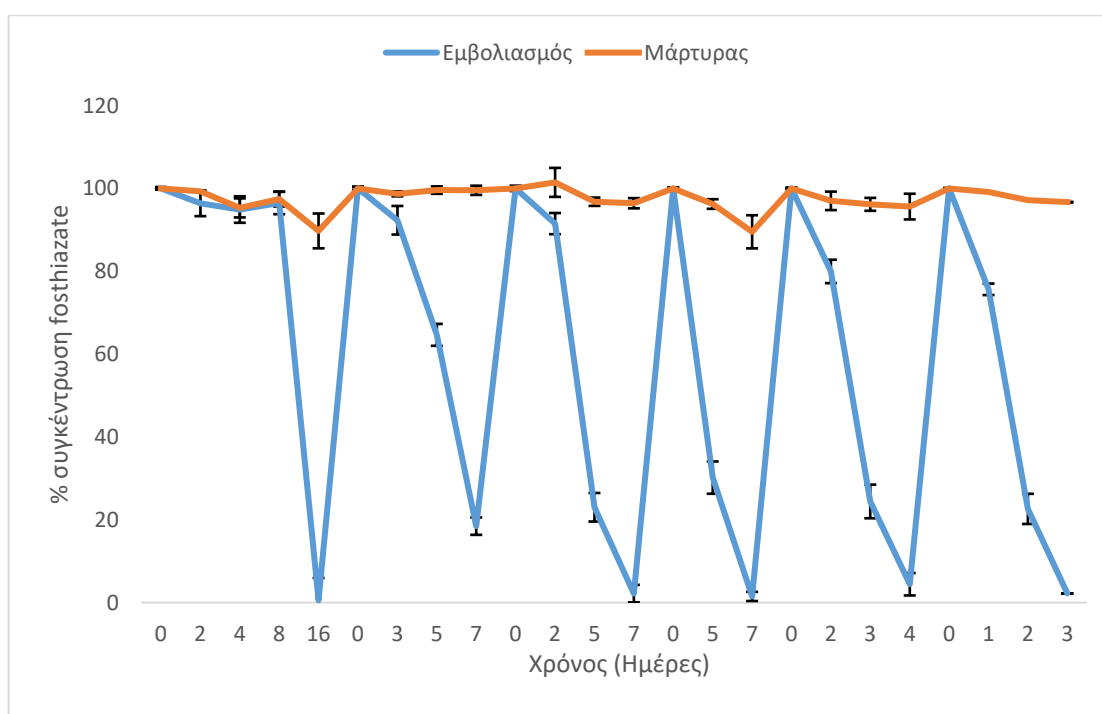


Διάγραμμα 3.1. Η αποδόμηση του fosthiazate στο έδαφος ύστερα από 2 επαναλαμβανόμενες εφαρμογές. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

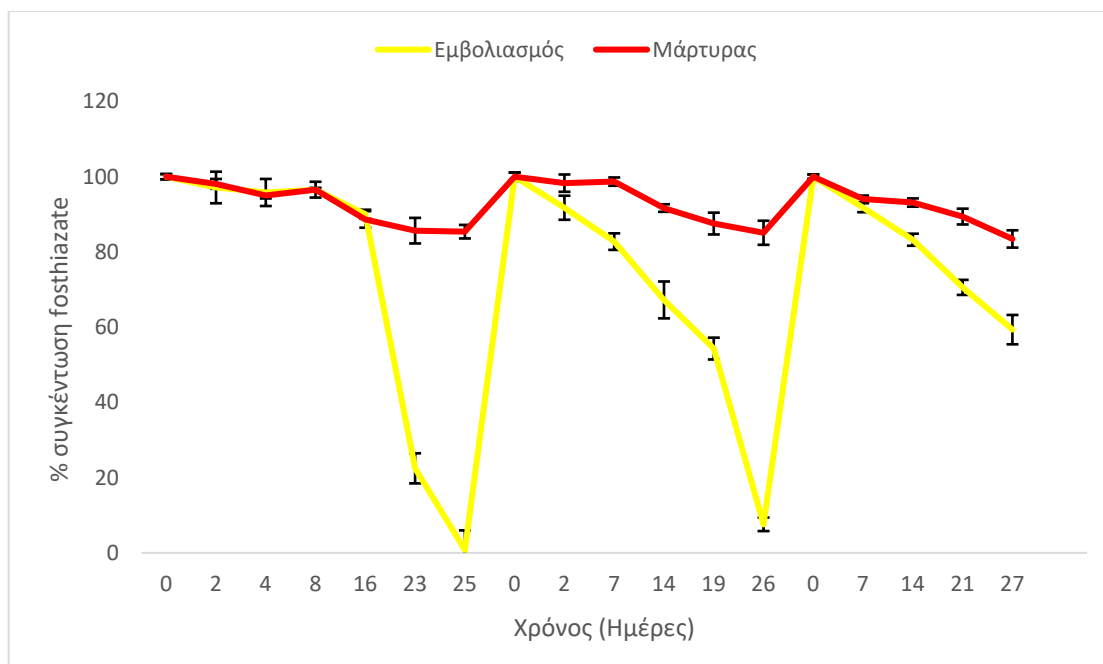
3.2 Αποδόμηση fosthiazate στις καλλιέργειες εμπλουτισμού

Μετά τη διαδικασία της ενεργοποίησης της μικροβιακής κοινότητας του επιλεγμένου εδάφους ξεκίνησε η διαδικασία εμπλουτισμού. Στα Διαγράμματα 3.2 και 3.3 παρουσιάζεται η αποδόμηση του fosthiazate σε υγρά θρεπτικά μέσα MSM και MSMN αντίστοιχα στους διάφορους κύκλους εμπλουτισμού. Η αποδόμηση του νηματοδωκτόνου ήταν αργή κατά τον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού και στα δύο θρεπτικά, με το MSM να παρουσιάζει βραδύτερη αποδόμηση. Ωστόσο από τον

δευτέρου κύκλου ανακαλλιέργειας άρχισε να παρουσιάζεται μια σημαντική απόκλιση στην αποδόμηση του fosthiazate ανάμεσα στα δύο θρεπτικά μέσα. Συγκεκριμένα στο θρεπτικό μέσο MSMN μετά από 7 ημέρες υπήρξε >80% αποδόμηση του fosthiazate, ενώ στο MSM αντίστοιχη αποδόμηση παρατηρήθηκε μετά τις 20 πρώτες ημέρες. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.2 η αποδόμηση του fosthiazate συνέχισε να είναι ταχύτατη και στους επόμενους κύκλους στο MSMN. Αντίθετα στο θρεπτικό μέσο MSM (Διάγραμμα 3.3) η αποδόμηση του fosthiazate δεν επιταχύνθηκε περαιτέρω στο 2^ο κύκλο ενώ στον 3^ο κύκλο παρατηρήθηκε αποδόμηση μόλις του 40% της αρχικής ποσότητας fosthiazate μετά από 27 ημέρες. Μετά από αυτά τα αποτελέσματα αποφασίστηκε να μην προχωρήσουμε σε επόμενο κύκλο ανακαλλιέργειας στο MSM. Κατά την πορεία του εμβολιασμού το fosthiazate ήταν σταθερό και στα δύο θρεπτικά μέσα καθώς δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (μάρτυρες).



Διάγραμμα 3.2. Η αποδόμηση του fosthiazate στους έξι κύκλους εμπλουτισμού σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε ή όχι με βακτήρια (μάρτυρας). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

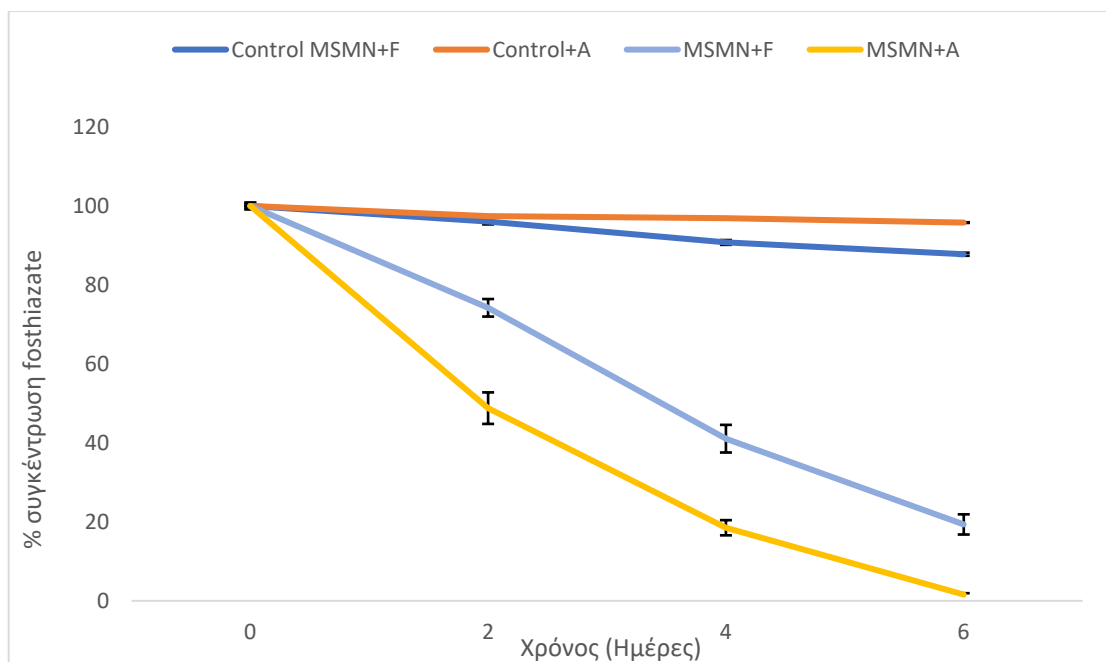


Διάγραμμα 3.3. Η αποδόμηση του fosthiazate στους τρεις κύκλους εμπλουτισμού σε εμβολιασμένο και σε μή εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSM (μάρτυρας). Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

3.3 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate

Όπως αναφέρεται και στην Παράγραφο 2.5.3 η πρώτη προσπάθεια απομόνωσης βακτηρίων δεν ήταν επιτυχής αφού καμία από τις 40 αποικίες που επιλέχθηκαν δεν παρουσίασε αποδομητική ικανότητα. Ακολούθησε νέα προσπάθεια απομόνωσης αποδομητικών βακτηρίων από αποικίες που αναπτύχθηκαν τόσο σε τρυβλία επιστρωμένα με MSMN+fosthiazate όσο και με LB.

Έτσι μελετήθηκε η ικανότητα αποδόμησης των εμπλουτισμένων καλλιεργειών σε θρεπτικά μέσα MSMN+A (χρησιμοποιήθηκε fosthiazate από πρότυπη αναλυτική ουσία) και MSMN+F (χρησιμοποιήθηκε σκευάσμα fosthiazate). Στο Διάγραμμα 3.4 παρουσιάζεται η αποδόμηση του fosthiazate σε MSMN+A και MSMN+F, κατά το δεύτερο κύκλο ανακαλλιέργειας. Παρατηρήθηκε ελαφρώς ταχύτερη αποδόμηση του fosthiazate σε MSMN+A.



Διάγραμμα 3.4. Η αποδόμηση του fosthiazate σε θρεπτικό μέσο MSMN+F (fosthiazate από σκεύασμα) και MSMN+A (fosthiazate από πρότυπη αναλυτική ουσία). Οι μάρτυρες (control) είναι μη εμβλιασμένες καλλιέργειες. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

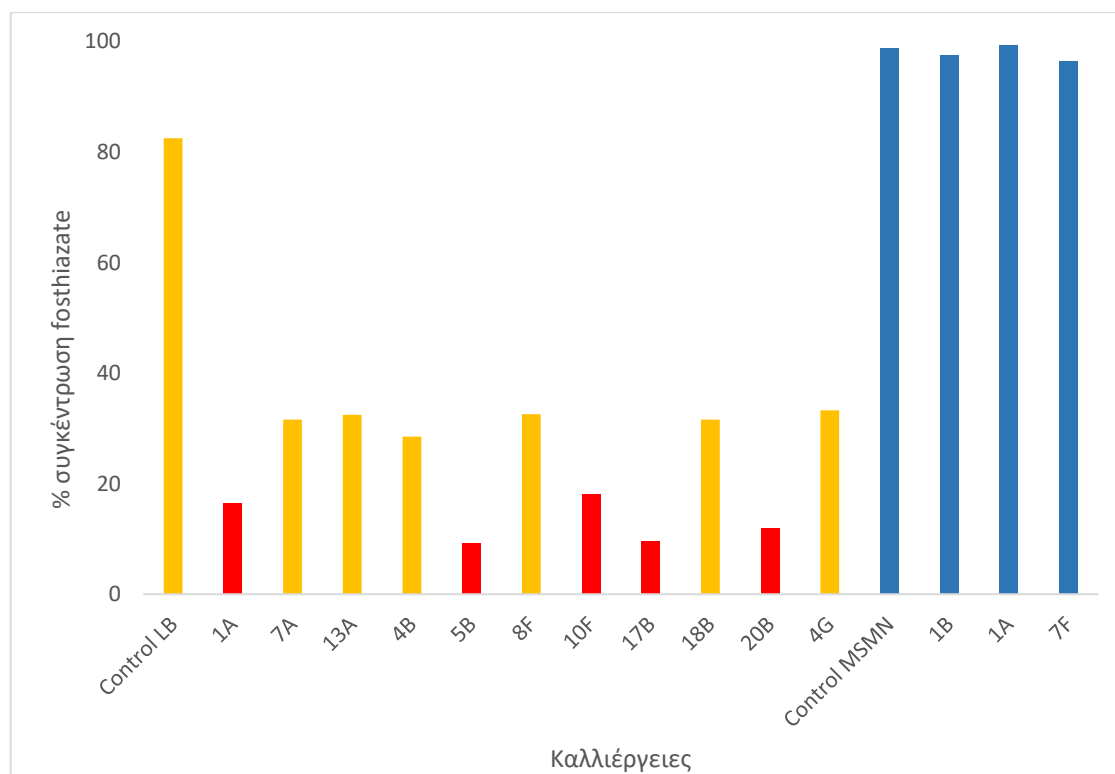
Ακολούθησε επίστρωση τρυβλίων MSMN και LB+fosthiazate A (20 mg/L), επώαση και επιλογή αποικιών για έλεγχο της αποδομητικής τους ικανότητας. Από την οπτική παρατήρηση των τρυβλίων καταγράφηκαν τέσσερις μορφολογικά διακριτοί τύποι αποικιών (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Μορφολογία των κύριων τύπων αποικιών που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικά μέσα MSMN και LB + fosthiazate.

Χαρακτηρισμός αποικίας	Μορφολογική περιγραφή
A	Στρογγυλή, μέτριο μέγεθος, διαφανής, θαμπή
B	Στρογγυλή, μέτριο μέγεθος, κίτρινη
F	Κρεμώδης, θαμπή, στρογγυλή, μεγάλη
G	Στρογγυλή, πολύ μικρό μέγεθος, διαφανής, ρόζ

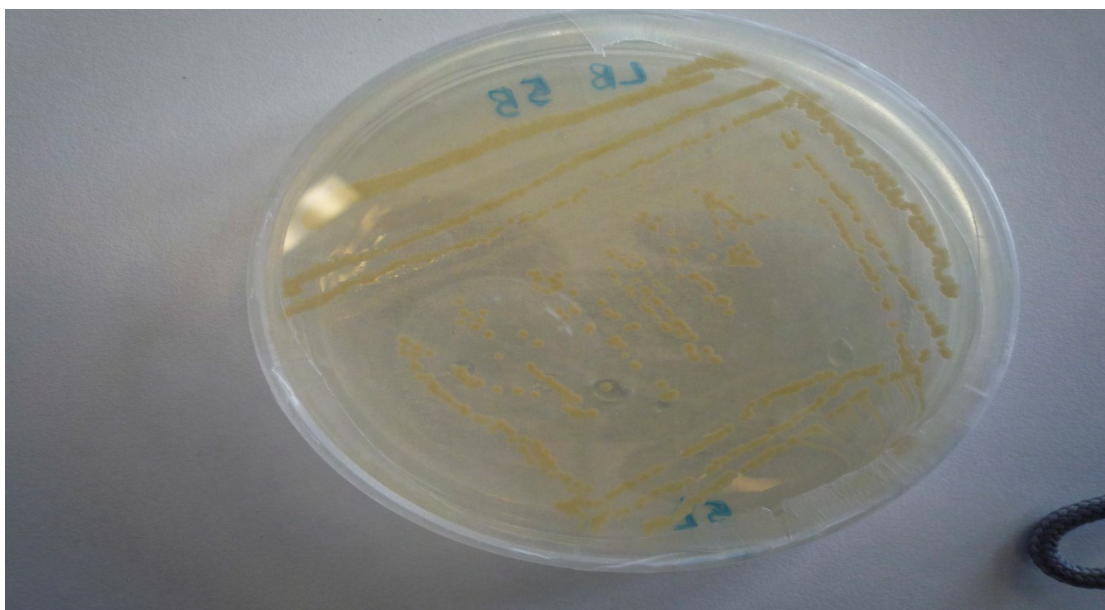
Είκοσι αποικίες επιλέχθηκαν από κάθε θρεπτικό μέσο και μεταφέρθηκαν σε υγρές καλλιέργειες του αντίστοιχου θρεπτικού. Στο Διάγραμμα 3.5 παρουσιάζεται η αποδόμηση του fosthiazate στις διάφορες καλλιέργειες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ύστερα από 14 ημέρες επώασης. Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση του fosthiazate σε καμία από τις βακτηριακές καλλιέργειες σε θρεπτικό

μέσο MSMN (ενδεικτικά παρουσιάζεται η αποδόμηση του fosthiazate σε 4 καλλιέργειες στο Διάγραμμα 3.5). Αντίθετα σε θρεπτικό μέσο LB παρατηρήθηκε αποδόμηση >60% στο σύνολο των αποικιών ενώ σε πέντε καλλιέργειες η αποδόμηση του fosthiazate ξεπέρασε το 80%. Οι τελευταίες επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη.

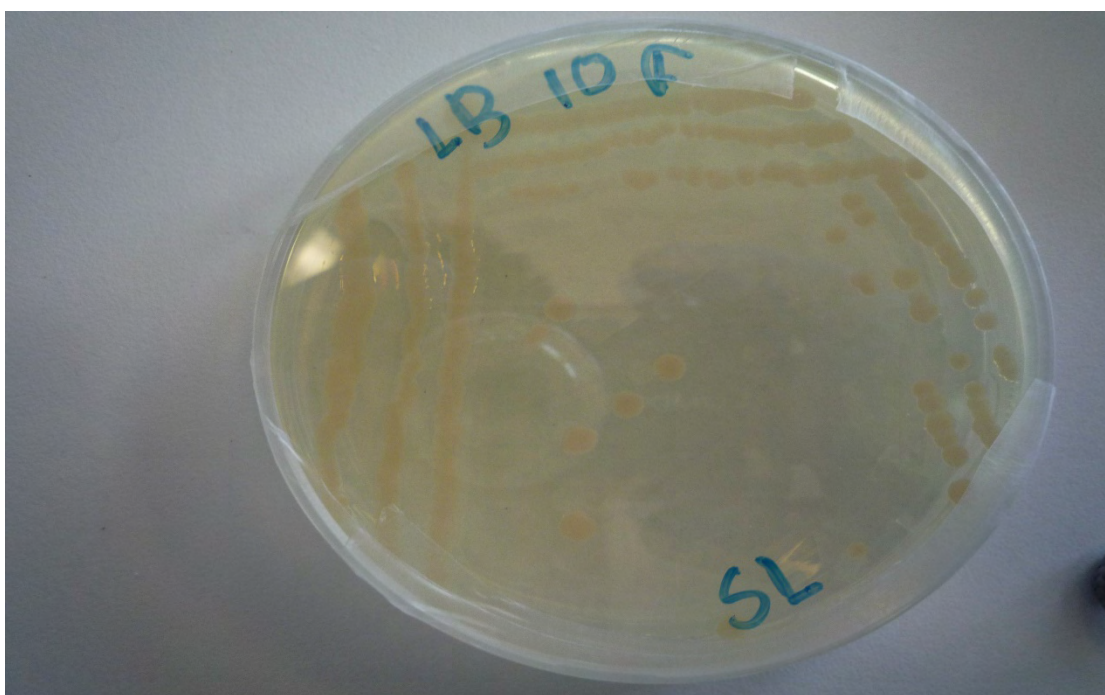


Διάγραμμα 3.5. Η αποδόμηση του fosthiazate από επιλεγμένες βακτηριακές καλλιέργειες σε θρεπτικά μέσα MSMN και LB ύστερα από 14 ημέρες επώασης. Οι πορτοκαλί και κόκκινες στήλες αντιστοιχούν σε καλλιέργειες σε μέσο LB ενώ οι μπλέ σε θρεπτικό μέσο MSMN. Αντίστοιχα παρουσιάζεται και το ποσοστό αποδόμησης του fosthiazate σε δείγματα μάρτυρες για κάθε θρεπτικό μέσο (control).

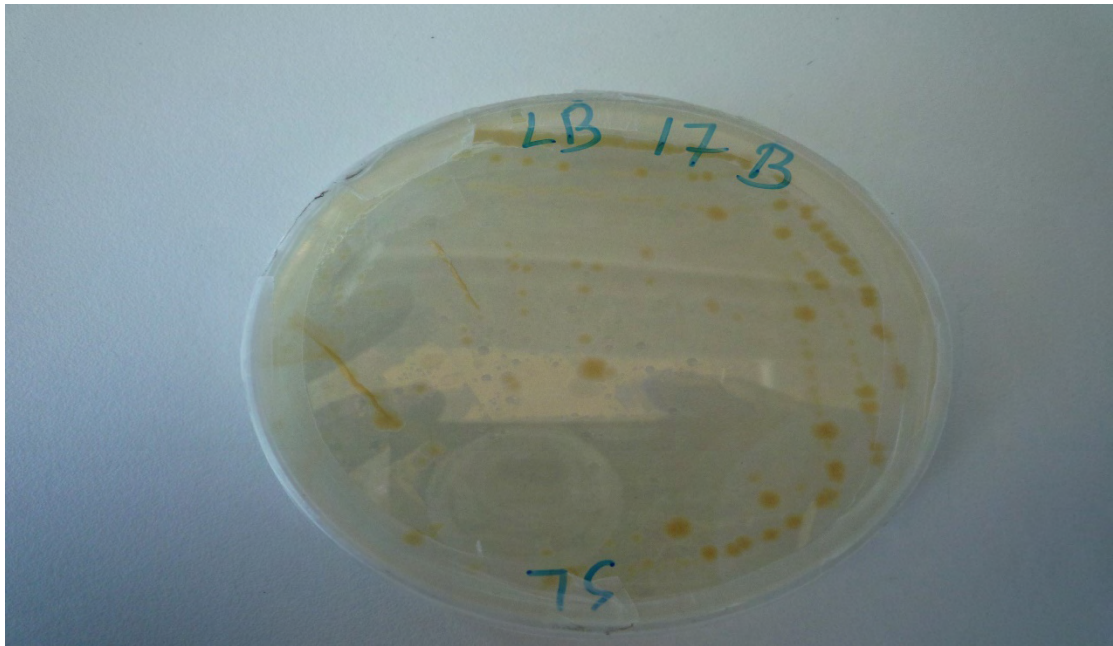
Οι αποικίες που επιλέχθηκαν αξιολογήθηκαν αρχικά για την αμιγότητα τους με επίστρωση σε θρεπτικό μέσο LB. Από παρατήρηση της εικόνας των τρυβλίων για κάθε καλλιέργεια προέκυψε ότι οι καλλιέργειες 5B, 17B και 10F ήταν αμιγείς (Εικόνες 6, 7, και 8) ενώ η 20B εμφανίστηκε μη αμιγής (Εικόνα 9). Όσον αφορά την αποικία 1A (Εικόνα 9) λόγω υπερανάπτυξης των βακτηριων στο τρυβλίο δεν μπόρεσαν να βγούν ασφαλή συμπεράσματα. Ωστόσο αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη της καθώς μορφολογικά φαινόταν να διαφέρει από τις υπόλοιπες.



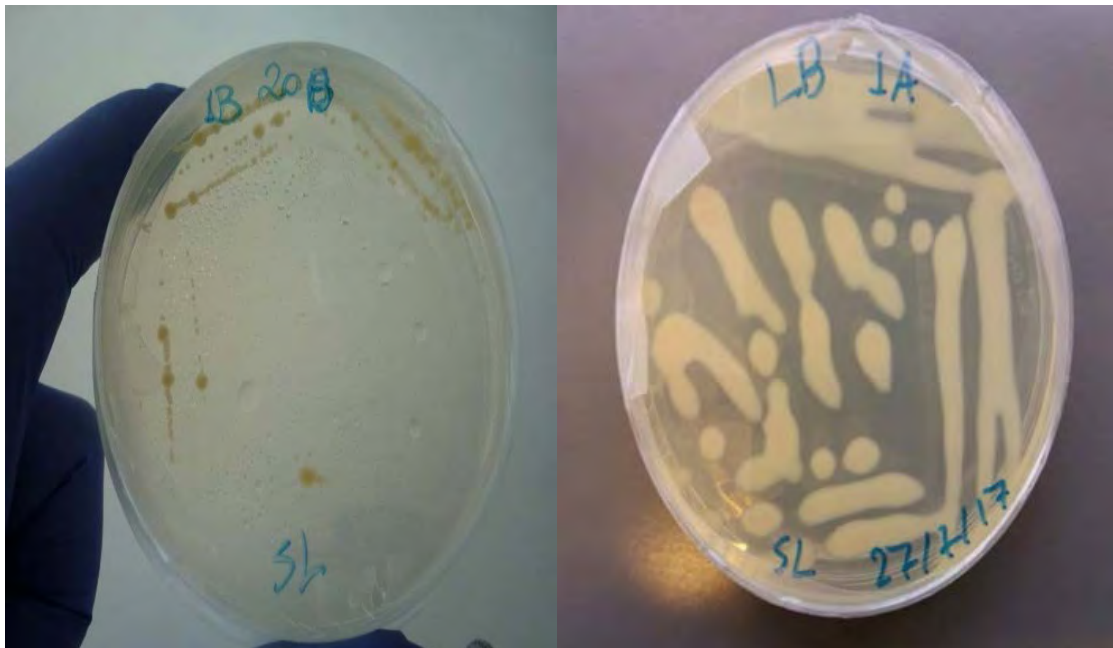
Εικόνα 6 τρυβλίο LB με επίστρωση της καλλιέργειας 5B



Εικόνα 7 τρυβλίο LB με επίστρωση της καλλιέργειας 10F



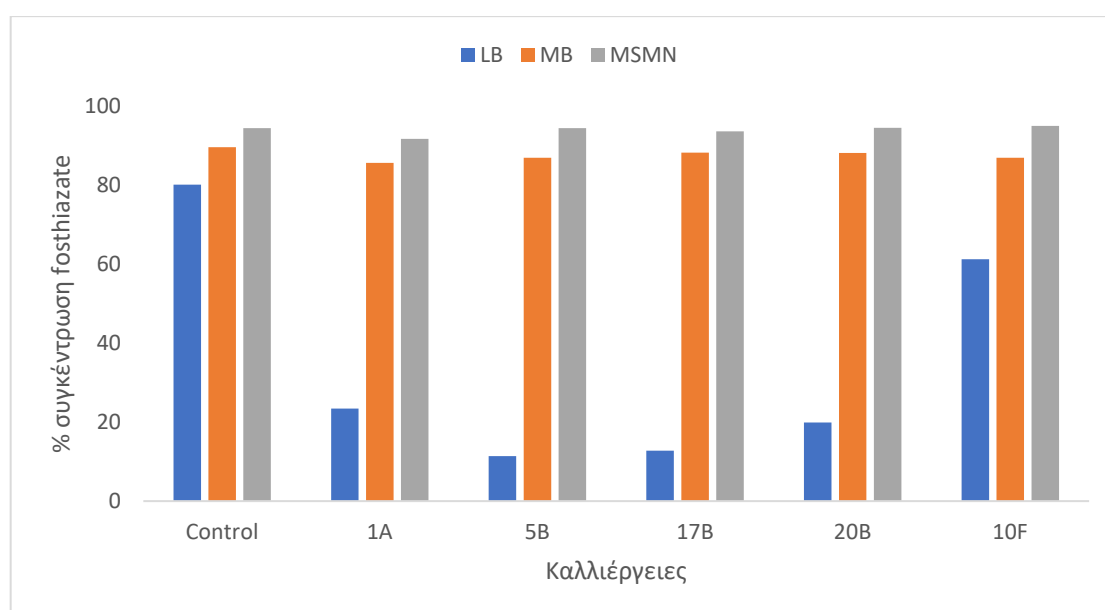
Εικόνα 8 τρυβλίο LB με επίστρωση της καλλιέργειας 17B



Εικόνα 8 τρυβλίο LB με επίστρωση των καλλιεργειών 20B και 1A

Ακολούθησε επανέλεγχος της αποδομητικής ικανότητας των πέντε επιλεγμένων καλλιεργειών (1A, 5B, 17B, 20B και 10F) σε θρεπτικά μέσα LB, MSMN και Mandelbaum+Μίγμα αμινοξέων. Στο Διάγραμμα 3.6 παρουσιάζεται η αποδόμηση

του fosthiazate από τις πέντε επιλεγμένες βακτηριακές καλλιέργειες στα τρία υγρά θρεπτικά μέσα 14 ημέρες μετά από τον εμβολιασμό. Καμία από τις επιλεγμένες καλλιέργειες δεν κατάφερε να αποδομήσει το fosthiazate στα θρεπτικά μέσα MSMN και Mandelbaum ενώ οι τέσσερις από τις πέντε αποικίες διατήρησαν την αποδομητική τους ικανότητα σε θρεπτικό μέσο LB. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε η καλλιέργεια 10F όπου η αποδόμηση του fosthiazate περιορίστηκε στο 40% της αρχικής ποσότητας. Έτσι η συγκεκριμένη καλλιέργεια δεν μελετήθηκε περαιτέρω, ενώ από τις υπόλοιπες τέσσερις καλλιέργειες έγινε δειγματοληψία για εξαγωγή DNA.

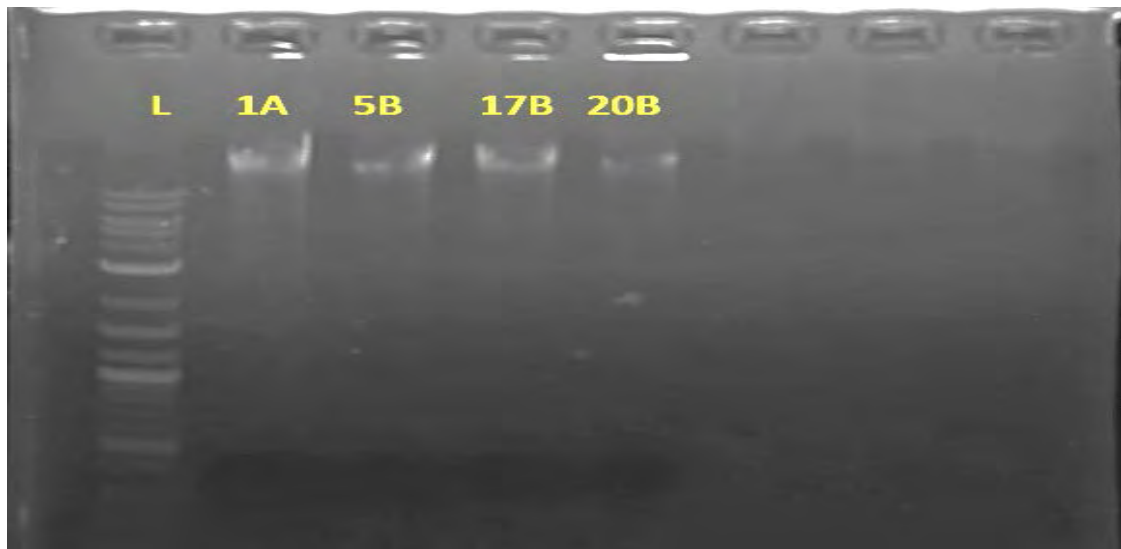


Διάγραμμα 3.6. Η αποδόμηση του fosthiazate από τις επιλεγμένες καλλιέργειες σε υγρά θρεπτικά μέσα MSMN, Mandelbaum (MB) και LB μετά από 14 ημέρες επώασης. Παράλληλα παρουσιάζεται και η αποδόμηση του fosthiazate σε μή εμβολιασμένες καλλιέργειες (controls).

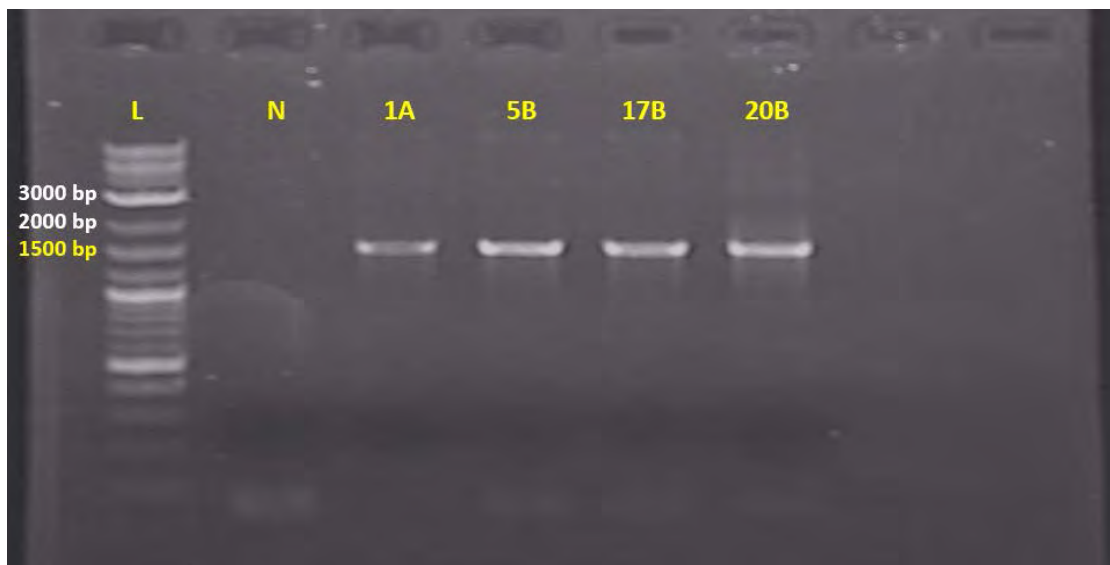
3.4 Ταυτοποίηση βακτηρίων που αποδομούν το fosthiazate

3.4.1 Εξαγωγή DNA, PCR ενίσχυση και ανάλυση DGGE

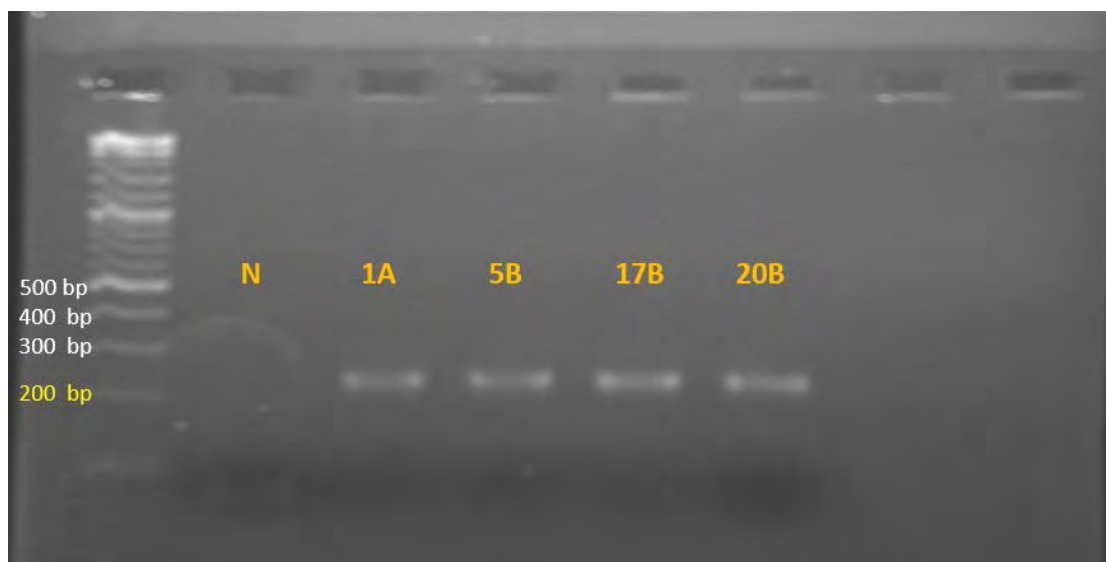
Ακολούθησε εξαγωγή DNA από τις τέσσερις καλλιέργειες, PCR ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA (1500bp), PCR εσωτερικής ένθεσης για το αρχικό προϊόν και ανάλυση DGGE για την ταυτοποίηση της αμιγότητας των επιλεγμένων αποικιών. Τα παραπάνω παρουσιάζονται στις Εικόνες 10, 11, 12 και 13 αντίστοιχα.



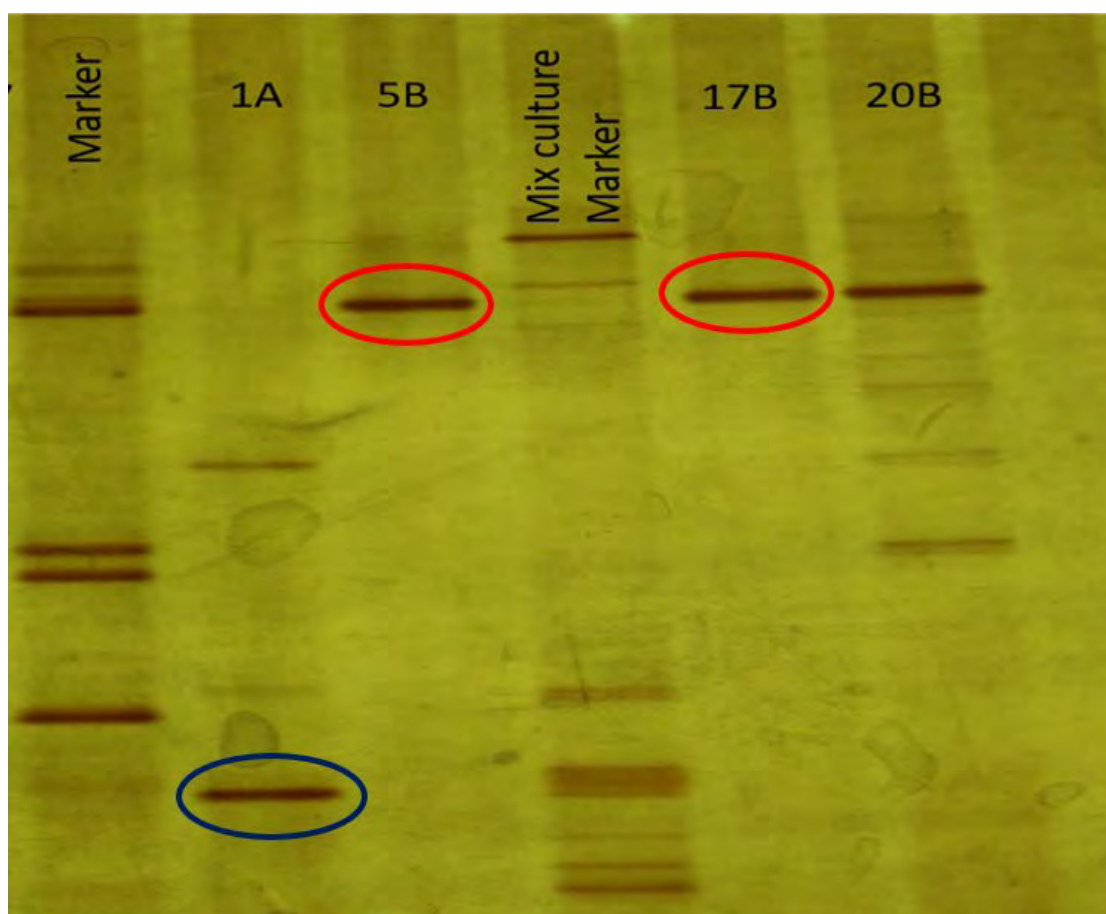
Εικόνα 9 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 0.7% ολικού DNA από τις υγρές καλλιέργειες 1A, 5B, 17B και 20B



Εικόνα 10 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων από την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA (1500bp). Το N αντιστοιχεί στον αρνητικό μαρτυρα της αντίδρασης. Θετικό προϊόν και για τα 4 δείγματα



Εικόνα 11 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% PCR προϊόντων εσωτερικής ένδεσης του γονιδίου 16S rRNA (περίπου 200 bp). Το N αντιστοιχεί στον αρνητικό μαρτυρα της αντίδρασης. Θετικό προϊόν και για τα 4 δείγματα

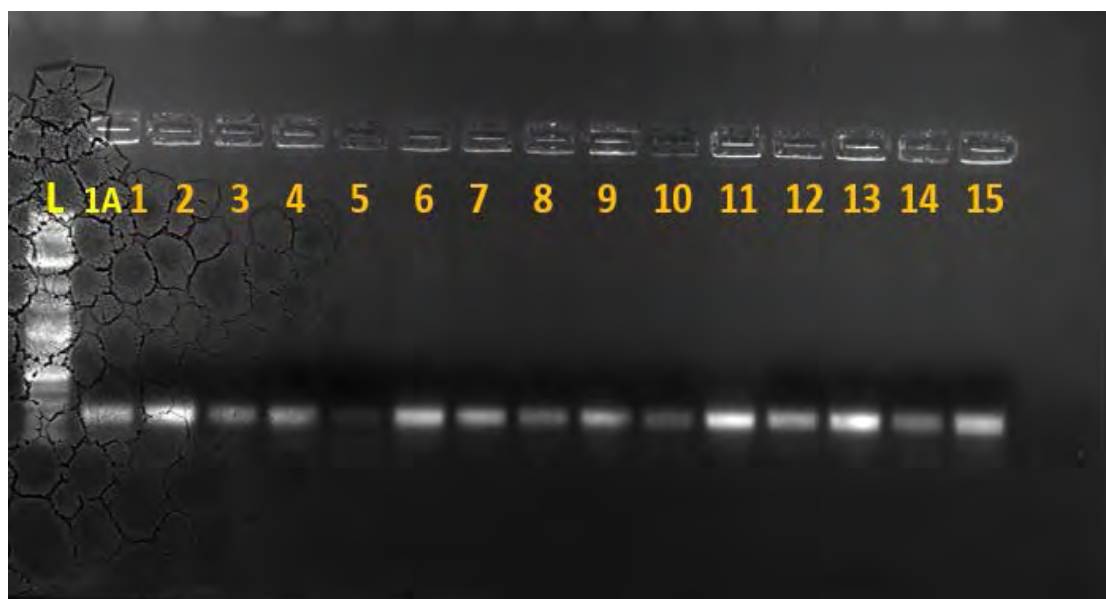


Εικόνα 12 Μοριακή αποτύπωση DGGE του 16S rRNA γονιδίου των 1A ,5B, 17B και 20B. Το δείγμα Marker είναι μίγμα από προϊόντα PCR, όπου ενισχύθηκε το 16S rRNA γονίδιο γνωστών βακτηρίων ενώ το δείγμα Mix culture Marker είναι PCR προϊόν από DNA από τις καλλιέργειες του 6^{ου} κύκλου εμπλουτισμού σε MSMN

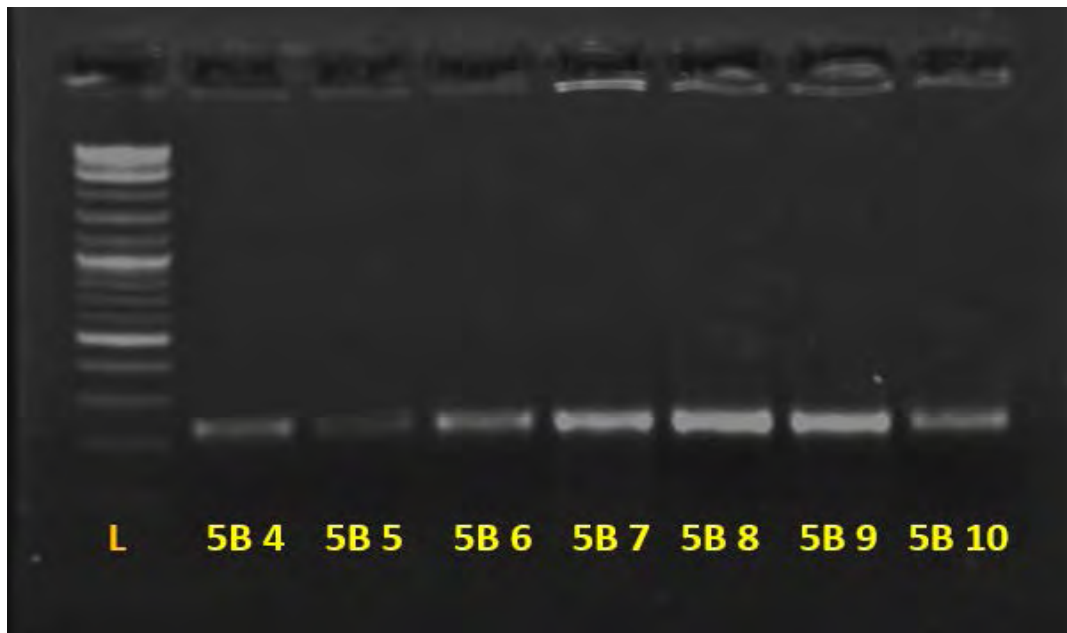
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13 στο μοριακό αποτύπωμα των καλλιιεργειών 5B, 17B και 20B υπάρχει η ίδια κυρίαρχη ζώνη η οποία διαφέρει από αυτήν που παρατηρείται στο δείγμα 1A. Επομένως οι συγκεκριμένες μορφολογικά όμοιες αποικίες αποτελούνταν από το ίδιο βακτήριο, ωστόσο μόνο οι δύο (5B, 17B) ήταν αμιγείς και επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη. Η DGGE ανάλυση έδειξε επίσης ότι ούτε η καλλιιεργεια 1A ήταν αμιγής καθώς το μοριακό της αποτύπωμα περιλαμβάνει άλλες δύο αθενούς έντασης ζώνες. Αυτό το γεγονός όπως και ότι η ζώνη αυτή διαφέρει από αυτήν που παρατηρείται στα άλλα τρία δείγματα οδήγησε στην επιλογή και της συγκεκριμένης καλλιιεργειας για περαιτέρω ανάλυση.

3.4.2 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα και εξαγωγή πλασμιδιακού DNA, αλληλούχιση και φυλογενετική ανάλυση

Την μοριακή αποτύπωση των καλλιιεργειών ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων PCR (1500 bp) για τα δείγματα 1A, 5B και 17B ένθεση τους σε πλασμιδιακό φορέα και μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli*. Ακολούθησε colony PCR για τις επιλεγμένες αποικίες και ανάλυση DGGE για επιλογή κλώνων προς αλληλούχιση και εξαγωγή πλασμιδιακού DNA προκειμένου να αποσταλεί για αλληλούχιση. Να σημειωθεί ότι για το δείγμα 17B, οι κλώνοι που επιλέχθηκαν μετά την colony PCR δεν έδωσαν ζώνες στην DGGE ανάλυση, γεγονός που υποδηλώνει την μη επιτυχή ένθεση. Έτσι αποφασίστηκε να συνεχιστεί η ανάλυση για τα άλλα δύο δείγματα που έδωσαν θετικά αποτελέσματα, αφού όπως φαίνεται και στην εικόνα 17, οι καλλιιεργειες 5B και 17B ανήκουν στο ίδιο βακτήριο.

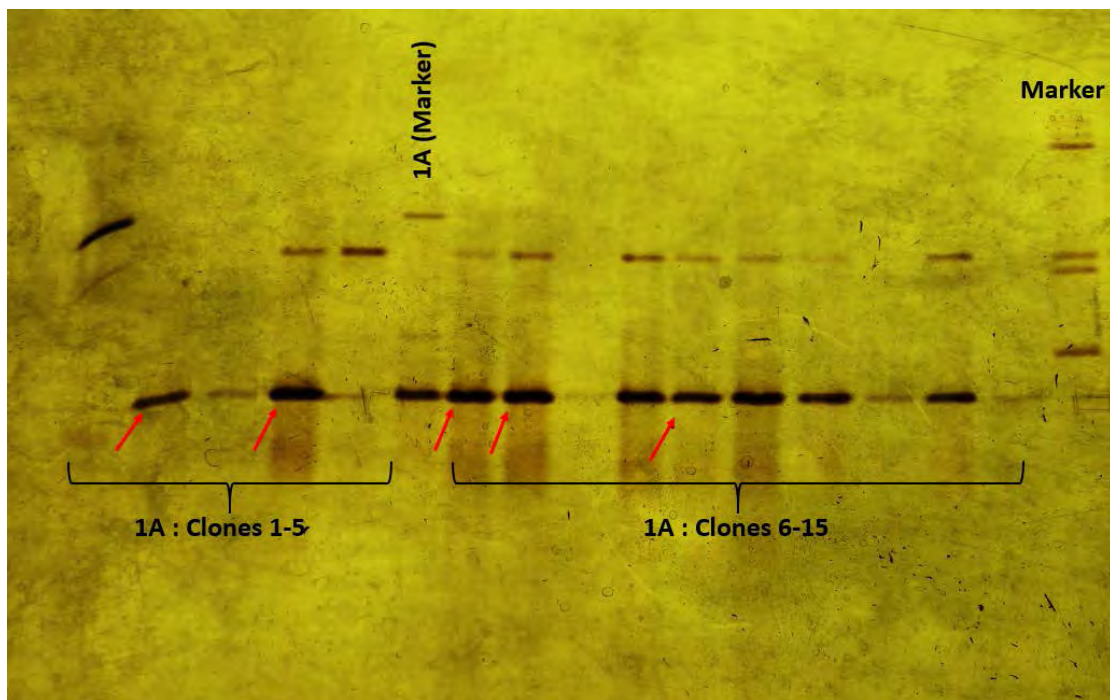


Εικόνα 13 Αποτελέσματα colony PCR για τους κλώνους της καλλιιεργειας 1A

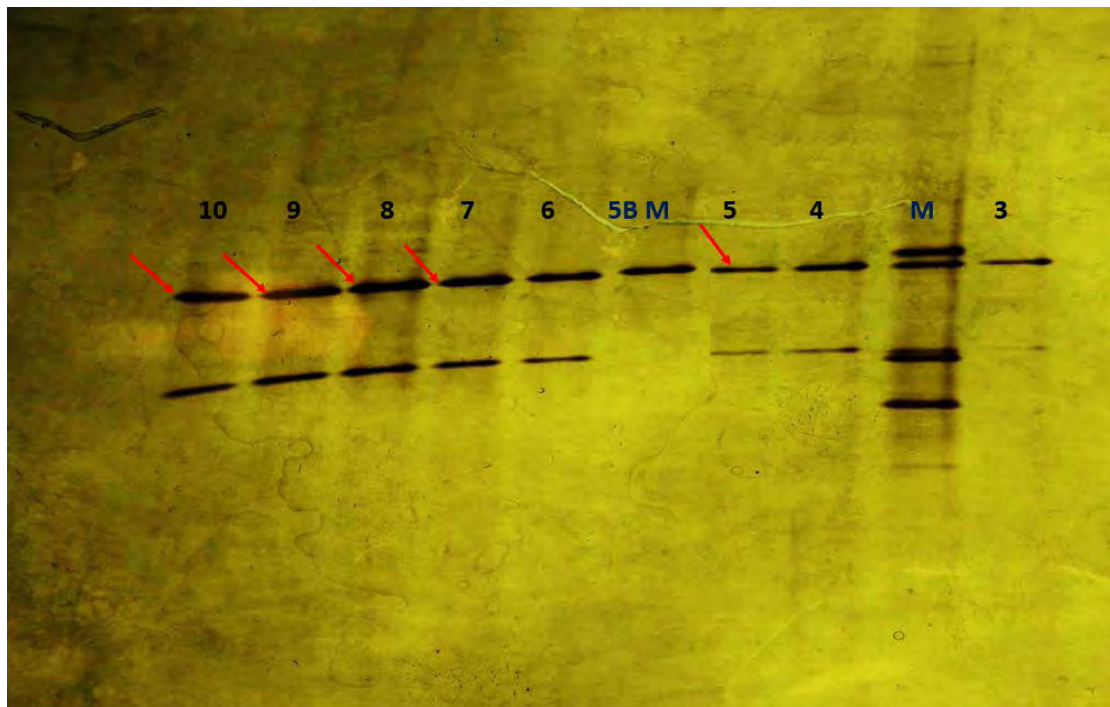


Εικόνα 14 Αποτελέσματα *colony PCR* για τους κλώνους της καλλιέργειας 5B

Στις Εικόνες 14 και 15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της *colony PCR* για τα δείγματα 1A και 5B. Η συγκεκριμένη αντίδραση PCR ενισχύει το βακτηριακό γονίδιο 16S rRNA. Επομένως στο DGGE θα εμφανιστούν δύο ζώνες, μία του γονιδίου που περιέχεται ως ένθεμα στον πλασμιδιακό φορέα και μία του 16S rRNA γονιδίου του *E. coli*.



Εικόνα 15 Αποτελέσματα DGGE ανάλυσης για τους επιλεγμένους κλώνους της καλλιέργειας 1A. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν ποιοί κλώνοι επιλέχθηκαν για εξαγωγή πλασμιδιακού DNA και αποστολή για αλληλούχιση. Διαδρομή 1A: το μοριακό αποτύπωμα της καλλιέργειας



Εικόνα 16 Αποτελέσματα DGGE ανάλυσης για τους επιλεγμένους κλώνους της καλλιέργειας 5B. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν ποιοί κλώνοι επιλέχθηκαν για εξαγωγή πλασμιδιακού DNA και αποστολή για αλληλούχηση. Διαδρομή 5B M: Μοριακό αποτύπωμα της καλλιέργειας 5B.

Στην Εικόνα 16 η επάνω ζώνη στα αποτυπώματα των αναλυθέντων κλώνων αντιπροσωπεύει το 16S rRNA γονίδιο του E.coli ενώ η κάτω ζώνη αντιπροσωπεύει το 16S rRNA γονίδιο που περιέχεται ως ένθεμα στον πλασμιδιακό φορέα. Όσον αφορά την Εικόνα 17 η επάνω ζώνη αντιστοιχεί στο ένθεμα του πλασμιδιακού φορέα και η κάτω ζώνη στο 16S rRNA γονίδιο του E.coli.



Εικόνα 17 Αποτελέσματα εξαγωγής πλασμιδιακού DNA από τους επιλεγμένους κλώνους

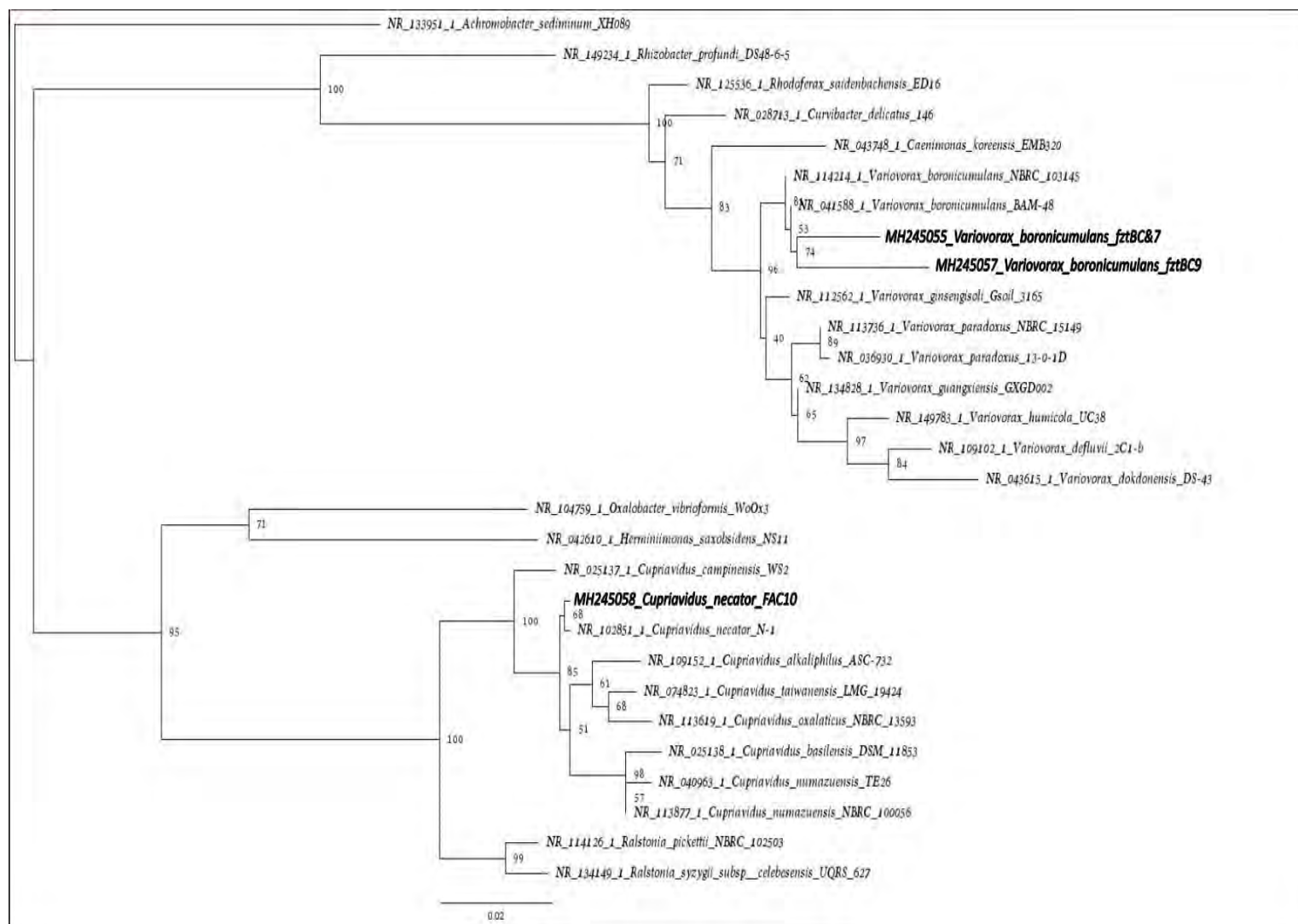
Αποτελέσματα αλληλούχησης και φυλογενετική ανάλυση

Από τα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχηση πλήρης ανάγνωση και συναρμολόγηση του 16S rRNA γονιδίου έγινε για τους κλώνους 1A 10 και 5B 5, 7, 8 και 9. Χρησιμοποιώντας το Online εργαλείο BLASTn στη συνέχεια προέκυψε για τον κλώνο 1A 10 υψηλή ομολογία με το στέλεχος *Cupriavidus necator strain N-1* (99%). Αντίθετα για τους κλώνους της καλλιέργειας 5B προέκυψε υψηλή ομολογία (>97%) με στελέχη του είδους *Varionorax boronicumulans*. Όι αλληλουχίες των κλώνων κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων *GeneBank* του *NCBI*. Στον Πίνακα 13 παρατίθενται οι αλληλουχίες όπως κατατέθηκαν, μαζί με τον αριθμό πρόσβασης (accession number).

Πίνακας 13 Ονομασία και αριθμός πρόσβασης των αλληλουχιών που κατατέθηκαν στην βάση δεδομένων GeneBank

Ονομασία αλληλουχίας	Αριθμός πρόσβασης
Varionorax_boronicumulans_strain_fztBC5	MH245054
Varionorax_boronicumulans_strain_fztBC7	MH245055
Varionorax_boronicumulans_strain_fztBC8	MH245056
Varionorax_boronicumulans_strain_fztBC9	MH245057
Cupriavidus_necator_strain_FAC10	MH245058

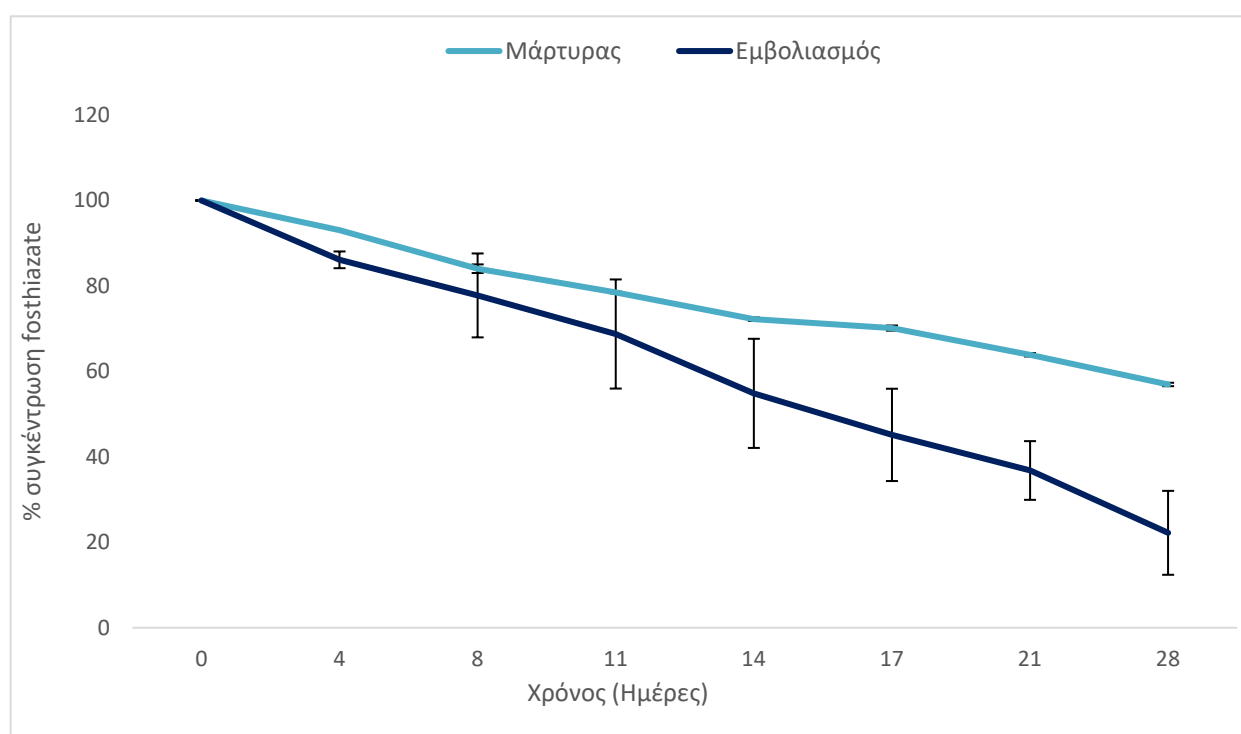
Τέλος πραγματοποιήθηκε κατασκευή φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιώντας αντιπροσωπευτικούς κλώνους για το βακτήριο *Varionorax boronicumulans*. Αυτή η επιλογή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Online έκδοσης του προγράμματος σύγκρισης και ομαδοποίησης πρωτεϊνικών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών **CD-HIT (92)**. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το cd-hit-est (για νουκλεοτιδικές αλληλουχίες) με κατώτατο όριο ταυτοποίησης 0.97. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν δύο ως αντιπροσωπευτικότερους κλώνους, τους C7 (*strain_fztBC7*) και C9 (*strain_fztBC9*). Επομένως αυτές οι αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 19. Όπως προκύπτει και τα δύο είδη ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια και μάλιστα στην ίδια τάξη (*Burkholderiales*) αλλά σε διαφορετικές οικογένειες, *Burkholderiaceae* (για το βακτήριο που ταυτοποιήθηκε ως *Cupriavidus necator*) και *Comamonadaceae* (για το βακτήριο που ταυτοποιήθηκε ως *Varionorax boronicumulans*).



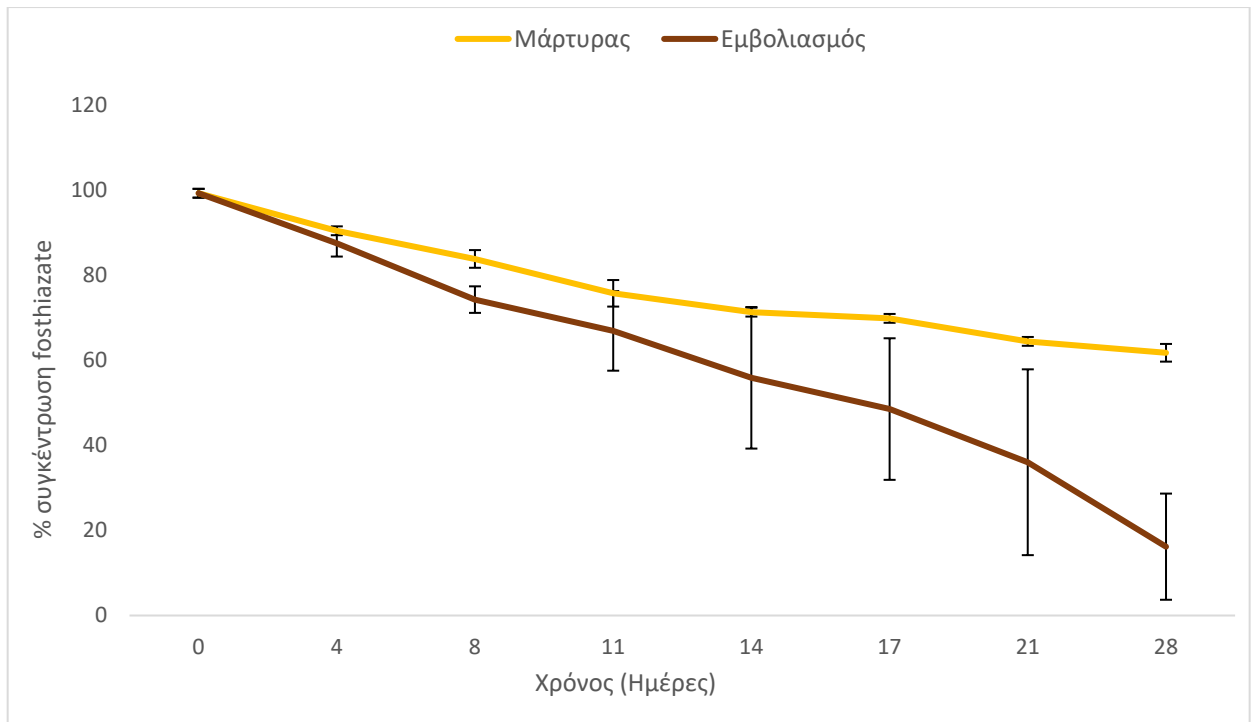
Εικόνα 18 Φυλογεντικό δέντρο που δείχνει τη γενετική σχέση των δύο υπό μελέτη βακτηρίων που χαρακτηρίστηκαν στην παρούσα μελέτη. Το δέντρο κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα PhyML v3.1 με χρήση του εξελικτικού μοντέλου general time reversible (GTR) με γ κατανομή ετερογένειας των ρυθμών εξέλιξης για τις διάφορες θέσεις, ενώ η ανάλυση bootstrap ορίστηκε στις 1000 δοκιμές. Η μπάρα κλίμακας αντιπροσωπεύει μια εξελικτική απόσταση (k_{nuc}) 0,02. Οι αλληλουχίες των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται με έντονη γραμματοσειρά.

3.5 Αξιολόγηση της ικανότητας του στελέχους *V. boronicumulans* 5B να αποδομεί υψηλές συγκεντρώσεις του fosthiazate

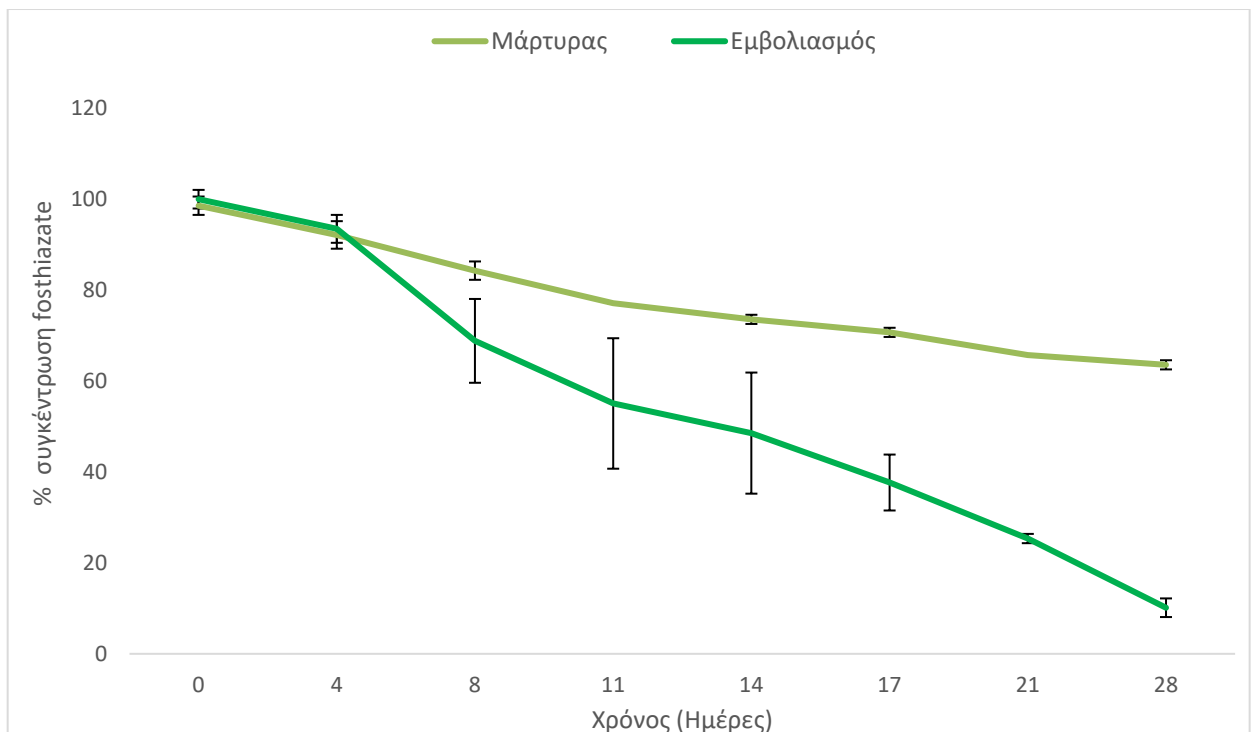
Η αποδόμηση των διάφορων συγκεντρώσεων fosthiazate από το στέλεχος 5B σε θρεπτικό μέσο LB παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 3.7-3.10 ενώ οι τιμές DT_{50} του fosthiazate στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις, όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO) παρουσιάζονται στον Πίνακα 14. Το στέλεχος 5B αποδόμησε περίπου το 80% του fosthiazate όταν αυτό προστέθηκε στο LB σε συγκεντρώσεις 20, 50 και 100 mg/L. Η ικανότητα αποδόμησης του βακτηριακού στελέχους δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την συγκέντρωση του fosthiazate στο εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 20 έως 100 mg/L όπως φαίνεται και από τις τιμές DT_{50} που ήταν 14,8, 14,4 και 11,2 ημέρες για επίπεδα συγκέντρωσης 20, 50 και 100 mg/L αντίστοιχα. Αντίθετα καταγράφηκε μια βραδύτερη αποδόμηση του fosthiazate στα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης (500 mg/L) που αποτυπώνεται και στην τιμή DT_{50} που έφτασε τις 20,3 ημέρες. Αποδόμηση που έφτασε στο επίπεδο του 40% της αρχικής συγκέντρωσης παρηγήθηκε και στις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ως μαρτυρες με τις τιμές DT_{50} να κυμαίνονται από 33,4 έως 51,4 ημέρες (Πίνακας 14).



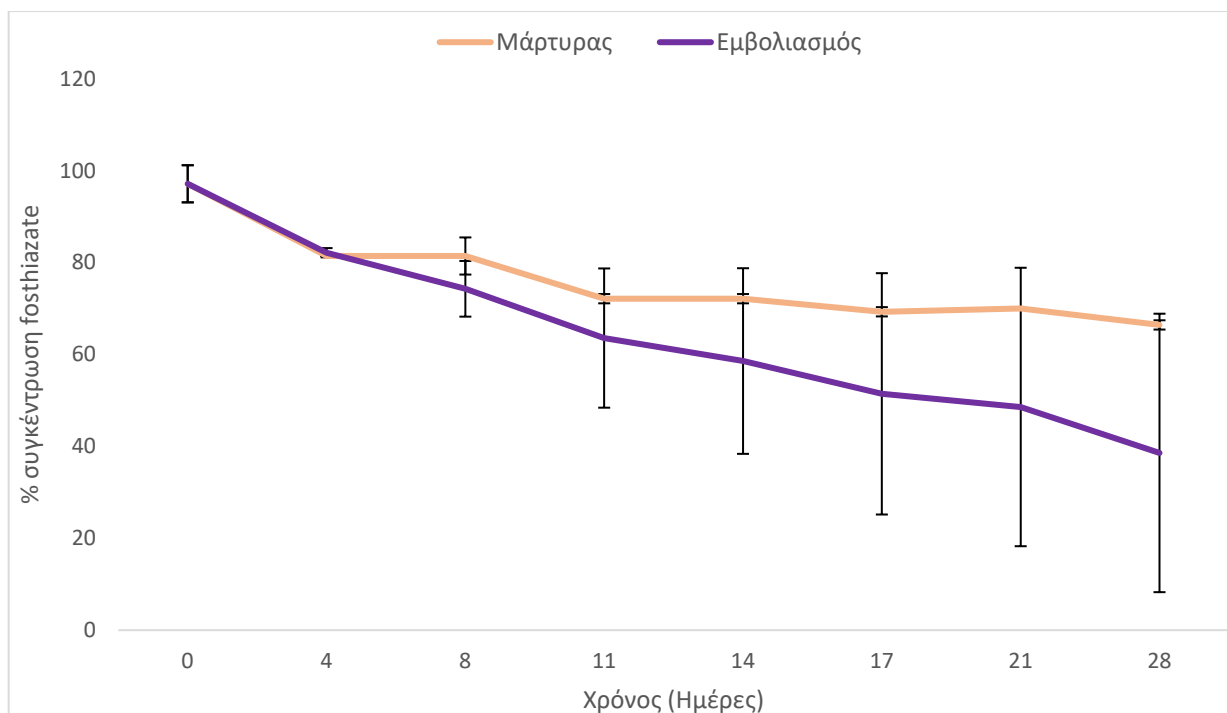
Διάγραμμα 3.7. Η αποδόμηση του fosthiazate (20 mg/l) από το στέλεχος *Variovorax boronicumulans* 5B σε θρεπτικό μέσο LB. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.8. Η αποδόμηση του fosthiazate (50 mg/L) από το στέλεχος *Varionorax borunicumtulan 5B* σε θρεπτικό μέσο LB με συγκέντρωση fosthiazate. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.9. Η αποδόμηση του fosthiazate (100 mg/L) από το στέλεχος *Varionorax borunicumtulan 5B* σε θρεπτικό μέσο LB με συγκέντρωση fosthiazate. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.10 Η αποδόμηση του fosthiazate (500 mg/L) από το στέλεχος *Varionorax borunicumulans* 5B σε θρεπτικό μέσο LB με συγκέντρωση fosthiazate . Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Πίνακας 14 Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση διαφορετικών συγκεντρώσεων του fosthiazate από το στέλεχος *Varionorax borunicumulans* 5B σε θρεπτικό LB όπως υπολογίστηκαν με το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO). Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τόσο από εμβολιασμένες όσο και από μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (Μάρτυρας) για όλες τις καλλιέργειες.

Συγκέντρωση fosthiazate	k (ημέρα ⁻¹)	DT ₅₀ (ημέρες)	χ^2 (%)
20 mg/L	0,047	14,8	5,4
20 mg/L Μάρτυρας	0,021	33,4	1,2
50 mg/L	0,048	14,4	6,7
50 mg/L Μάρτυρας	0,019	36,6	2,5
100 mg/L	0,062	11,1	8,4
100 mg/L Μάρτυρας	0,017	39,1	2,3
500 mg/L	0,034	20,3	2,1
500 mg/L Μάρτυρας	0,013	51,4	4,1

4 Συζήτηση

4.1 Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του fosthiazate

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν με τη μέθοδο των εμπλουτισμένων καλλιεργειών τέσσερις βακτηριακές καλλιεργειες με την ικανότητα ταχείας αποδόμησης του οργανοφωσφορικού νηματοδωκτόνου fosthiazate. Μεσω ανάλυσης της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου και μοριακή αποτύπωση DGGE αποδείχθηκε ότι δύο εξ αυτών ήταν αμιγείς και οι υπόλοιπες δύο μικτές. Οι δύο αμιγείς καλλιέργειες περιελάμβαναν ένα βακτήριο του γένους *Varionorax borunicumulans* ενώ και η μία εκ των μικτών καλλιεργειών περιελάμβανε ως κυρίαρχο μέλος το συγκεκριμένο βακτήριο. Τέλος η δεύτερη μικτή καλλιέργεια αποτελείτο από ένα βακτήριο που ανήκει στο είδος *Cupriavidus necator*, που αναφέρεται και ως *Ralstonia eutropha* (93), ως κύριο μέλος ενώ δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί η ταυτοποίηση των άλλων δύο μελών της καλλιέργειας. Η συγκεκριμένη είναι και η πρώτη αναφορά απομόνωσης βακτηρίων ικανών να αποδομούν το fosthiazate, ως συνέχεια προηγούμενων μελετών που έδειξαν την εμφάνιση του φαινομένου της επιτάχυνομενης βιοαποδόμησης για το συγκεκριμένο νηματοδωκτόνο σε εδάφη πατατοκαλλιεργειας στην Ελλάδα (83).

Βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στα γένη *Varionorax* και *Cupriavidus* και είχαν την ικανότητα να αποδομούν άλλα γεωργικά φάρμακα έχουν απομονωθεί και σε άλλες ανάλογες μελέτες. Συγκεκριμένα στελέχη του γένους *Varionorax* φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση φαινολογικών ζιζανιοκτόνων όπως τα linuron (94,95) και diuron (96) και στη χρήση τους ως πηγή C και ενέργειας. Στις παραπάνω μελέτες τα στελέχη του γένους *Varionorax* απομονώθηκαν ως μέλη βακτηριακών κοινοπραξιών. Σε μια απο τις μελέτες μάλιστα (96) μέλος της κοινοπραξίας ήταν και ένα στέλεχος του γένους *Cupriavidus* με την ικανότητα αποδόμησης ενός εκ των μεταβολιτών του linuron. Σε άλλη μελέτη (97) ένα στέλεχος *Varionorax* συμμετείχε επίσης σε μία βακτηριακή κοινοπραξία με την ικανότητα αποδόμησης του ζιζανιοκτόνου atrazine. Όσον αφορά συγκεκριμένα το είδος *Varionorax borunicumulans*, αυτό περιλαμβάνει και στελέχη που έχουν αναφερθεί να εμπλέκονται στην αποδόμηση του νεονικοτινοειδούς εντομοκτόνου thiacloprid (98). Σε άλλη μελέτη (99) βακτήρια του είδους *V. borunicumulans* αποδόμησαν ταχύτατα την νευροτοξική και καρκινογόνο ένωση ακρυλαμίδιο, χρησιμοποιώντας την μάλιστα ως μοναδική πηγή C και N. Όσον αφορά την ικανότητα στελεχών του γένους *Varionorax* να αποδομούν οργανοφωσφορικά γ.φ. δεν υπάρχουν ιδιαίτερες αναφορές. Ωστόσο σε μία μελέτη σε εδάφη απο καλλιέργειες ρυζιού (100) απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τρία βακτήρια με την ικανότητα αποδόμησης του parathion και οκτώ ζεύγη βακτηρίων που παρουσίασαν συνεργατική σχέση

κατά το μεταβολισμό του parathion. Στα συγκεκριμένα ζεύγη συμμετείχαν στελέχη του είδους *V. borunicumulans*.

Όσον αφορά βακτηριακά στελέχη του γένους *Cupriavidus*, πολλά από αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή μεταβολική ευελιξία έναντι πολλών οργανικών ρύπων η οποία θα μπορούσε να επεκταθεί περαιτέρω με την απόκτηση πλασμιδίων που κωδικοποιούν εξειδικευμένα καταβολικά χαρακτηριστικά (101). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το στέλεχος *Cupriavidus necator* JMP134 που έχει την ικανότητα να αποδομεί εύρος χλωροαρωματικών ενώσεων (102). Πρόσφατα απομονώθηκαν άλλα δύο στελέχη, τα *Cupriavidus campinensis* (103) και *Cupriavidus gilardii* T-1 (104) με ικανότητα αποδόμησης του 2,4-διχλωροφαινοξυοξικού οξέως. Σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη (105), βακτήριο του γένους *Cupriavidus* χαρακτηρίστηκε ως μέλος μίας βακτηριάκης κοινοπραξίας που είχε την ικανότητα αποδόμησης του καρβαμιδικού carbofuran. Τέλος υπάρχουν κάποιες περιορισμένες αναφορές για βακτηριακά στελέχη του γένους *Cupriavidus* με την ικανότητα να αποδομούν οργανοφωσφορικά γ.φ. Συγκεκριμένα το στέλεχος *Cupriavidus* sp. DT-1 απομονώθηκε με την ικανότητα να αποδομεί ταχύτατα το chlorpyrifos και τον μεταβολίτη του TCP (70). Σε άλλη μελέτη (106) το στέλεχος *C. necator* AAJ1 αποδόμησε το οργανοφωσφορικό phorate σε ποσοστό 85% εντός 10 ημερών. Τέλος τα στελέχη *Cupriavidus* sp. Fd9 και *C. necator* Fd14, απομονώθηκαν ως βακτήρια που αποδομούν το οργανοφωσφορικό νηματωδοκτόνο fenamiphos (82). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην ίδια μελέτη τα στελέχη αυτά δεν μπόρεσαν να αποδομήσουν το fosthiazate.

Στην παρούσα μελέτη ο εμπλουτισμός καλλιεργειών σε θρεπτικό μέσο MSM έδειξε ότι το N που περιέχει το μόριο fosthiazate δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς. Αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι το άτομο του αζώτου βρίσκεται στον 1,3 τριαζολινιδικό δακτύλιο που αποτελεί την αποχωρούσα ομάδα του οργανοφωσφορικού νηματωδοκτόνου. Πιθανόν τα αποδομητικά βακτήρια που απομονώθηκαν (όπως και κανένα άλλο μέλος της συγκεκριμένης μικροβιακής κοινότητας) να μην μπορούν να μεταβολίσουν περαιτέρω το συγκεκριμένο μόριο. Στις περισσότερες περιπτώσεις μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί και είχαν την ικανότητα να χρησιμοποιούν την οργανοφωσφορική ένωση ως πηγή N, οφείλεται στην ικανότητα τους να μεταβολίζουν αζωτούχους μεταβολίτες που προκύπτουν από την υδρόλυση του αρχικής ένωσης (65).

Επιπλέον, ενώ κατά τον εμπλουτισμό των καλλιεργειών παρατηρήθηκε ταχύτατη αποδόμηση του fosthiazate, οι μεμονωμένες αποικίες που επιλέχθηκαν από τις καλλιέργειες αυτές και καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο (MSMN) δεν παρουσίασαν αποδομητική ικανότητα. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και σε άλλα εκλεκτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν. Αντίθετα, στο πλούσιο θρεπτικό μέσο LB παρατηρήθηκε σημαντική μικροβιακή αποδόμηση του fosthiazate από τα επιλεγμένα βακτήρια. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα βακτήρια που

απομονώθηκαν πιθανώς δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το fosthiazate ως μοναδική πηγή άνθρακα και η αποδόμηση του νηματοδοκτόνου πραγματοποιείται συμμεταβολικά. Υπάρχουν διάφορες μελέτες όπου απομονωθηκαν βακτήρια που αποδομούσαν οργανοφωσφορικά γ.φ. συμμεταβολικά (41).

4.2 Τελικά Συμπεράσματα

Συμπερασματικά για την παρούσα μελέτη μπορούμε να καταλήξουμε στα εξής:

- Απομονώθηκαν δύο βακτηριακές καλλιέργειες που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το fosthiazate. Η πρώτη εξ αυτών ήταν αμιγής και περιελάμβανε βακτήριο του είδους *Variovorax borunicumulans* ενώ η δεύτερη ήταν μικτή με κυριάρχο μέλος βακτήριο του είδους *Cupriavidus necator*.
- Τα συγκεκριμένα βακτήρια είχαν την ικανότητα να αποδομούν αποτελεσματικά το fosthiazate σε θρεπτικό μέσο LB.
- Το *Variovorax borunicumulans* στέλεχος 5B παρουσίασε ικανοποιητική αποδομητική ικανότητα ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις του fosthiazate (έως και 100 mg/L).
- Το *Variovorax borunicumulans* στέλεχος 5B αποτελεί τον πρώτο απομονωθέντα μικροοργανισμό με ικανότητα αποδόμησης του οργανοφωσφορικού fosthiazate.

4.3 Μελλοντικοί ερευνητικοί στόχοι

Το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης δημιουργούν και νέα ερωτήματα. Μελλοντικές ερευνητικές προσεγγίσεις θα εστιάσουν:

- Στην απομόνωση αμιγών αποικιών του *Cupriavidus necator* κυριάρχου βακτηρίου της καλλιέργειας 1A, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ικανότητα του να αποδομεί το fosthiazate.
- Στη ταυτοποίηση και ανάλυση των γονιδίων και ενζύμων που κωδικοποιούν τα απομονωθέντα βακτήρια και είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση του fosthiazate.
- Στη διερεύνηση του μεταβολικού μονοματιού αποδόμησης του fosthiazate και στη μελέτη των μεταβολιτών που παράγονται.
- Τέλος στη διερεύνηση της χρήσης του *Variovorax borunicumulans* σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης ρυπασμένων εδαφών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Εμμανουήλ Δ. Τσοχατζής**, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (2012)
2. **Β. Ζιώγας και Γ.Α. Μάρκογλου**, Φαρμακολογία, ΑΘΗΝΑ, 2007.
3. **Malato S., Caceres J., Agüera A., Mezcua M., Hernando D., Vial J., Fernandez-Alba A.R.**, (2001). Degradation of imidacloprid in water by photo-Fenton and TiO₂ photocatalysis at a solar pilot plant: A comparative study, *Environmental Science and Technology*, 35, 4359-4366.
4. **Rial-Otero, R., Gonzalez-Rodriguez, R., Cancho-Grande, B., Simal-Gandara, J.**, 2004. Parameters affecting extraction of selected fungicides from vineyard soils. *J. Agric. Food Chem.* 52 (24), 7227–7234
5. **Gonzalo C. López-Pérez, Manuel Arias-Estévez, Eugenio López-Periago, Benedicto Soto-González, Beatriz Cancho-Grande, and Jesús Simal-Gándara**, 2006. Dynamics of Pesticides in Potato Crops. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (5), pp 1797–1803
6. **Arias-Estevez, M., Soto-Gonzalez, B., Lopez-Periago, E., Cancho-Grande, B., Simal-Gandara, J.**, 2005a. Atrazine sorption dynamics in organic matter rich-soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 264–271.
7. **Carmen López-Blanco, Sonia Gómez-Álvarez, María Rey-Garrote, Beatriz Cancho-Grande, Jesús Simal-Gándara**, 2005. Determination of carbamates and organophosphorus pesticides by SDME–GC in natural water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Volume 383, Issue 4, pp 557–561.
8. **Linn, D.M., Carski, T.H., Brusseau, M.L., Chang, F.H. (Eds.)**, 1993. Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil. *Soil Science Society of America*, Madison, WI, p. 260.
9. **Ludwig Simon, Michael Spiteller, Albert Hairch and, Peter R. Wallnofer**, 19912. Influence of Soil properties on the degradation of the nematocide fenamiphos. *Soil Bioi. Biochem.* Vol. 24, No. 8, PP. 769-17
10. **Levanon D.**, (1993). Roles of Fungi and Bacteria in the mineralization of pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 25, 1097-1105.
11. **Aislabie J., and Lloyd-Jones G.**, (1995). A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. *Australian Journal of Soil Research*. 33, 925-942.
12. **Edward Topp, Donald W. Gutzman, Bernard Bourgoin, Jacques Millette and Donald S. Gamble**, 1995. Rapid mineralization of the herbicide atrazine in alluvial sediments and enrichment cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 14, No. 5, pp. 743-747.
13. **Cesare Accinelli, Giovanni Dinelli, Alberto Vicari, Pietro Catizone**, 2001. Atrazine and metolachlor degradation in subsoils. *Biol Fertil Soils* 33:495–500
14. **Di H.J., Aylmore L.A.G. and Kookana R.S.** (1998). Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Science* 163: 404-411.

15. **D. L. Suet, A. A. Jukes and N. R. Parekh**, 1996. Non-specific influence of pH on microbial adaptation and insecticide efficacy in previously-treated field soils. *Soil Bin/. Eiochem.* Vol. 28, No. 12, pp. 1783-179.
16. **Bollag J.M. and Liu S.Y.**, (1990). Biological transformation processes of pesticides, in *Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling*. Soil Science Society of America. 169-261.
17. **Kookana R. S., Baskaran S., and Naidu R.**, (1998). Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review, *Australian Journal of Soil Research*. 36, 715-764.
18. **Alexander M.** (1999), "Biodegradation and Bioremediation", Second Edition, Ithaca, New York: Academic Press, ISBN 0-12-049861-8.
19. **Kenneth D. Racke and Joel R Coats**, 1988. Comparative Degradation of Organophosphorus Inseticides in Soil: Specificity of Enhanced Microbial Degradation. *J.Agric. Food Chem.* 36, 193-199
20. **D.C. Read**, 1986. Accelerated microbial breakdown of carbofuran in soil from previously treated fields. *Agriculture, Ecosystems & Environment* Volume 15, Issue 1, Pages 51-61
21. **Felsot A.S., Shelton D.R.**, (1993). Enhanced biodegradation of soil pesticides: Interactions between physicochemical process and microbial ecology. *SSSA Special Publication* 32: 227-251.
22. **Nezha Tahri Joutey, Wifak Bahafid, Hanane Sayel and Naïma El Ghachtouli**, 2013. Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. *Biodegradation - Life of Science*. Chapter 11.
23. **Dimitrios G. Karpouzas, AllanWalker**, 2000. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil. *Soil Biology and Biochemistry* Volume 32, Issues 11–12, 1 October 2000, Pages 1753-1762
24. **Felsot A.S.** (1989). Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for argoecosystems. *Annual Review of Entomology* 34: 453-476.
25. **Arbeli Z., Fuentes C.L.** (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions: and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, 26: 1733-1746.
26. **Walker A. and Roberts S.J.** (1993). Degradation, biodegradation and enhanced biodegradation. In: *Proceedings IX Symposium Pesticide Chemistry*, Piacenza, Italy, pp: 357-370.
27. **Anderson J.P.E., Nevermann K. and Haidt H.**, 1998. Accelerated microbial degradation of nematicides in soils: Problem and its management. In: *Proccedings of the XII Acorbat Meeting*. Guayaquil, Ecuador, pp 568-57.
28. **Chapman, R.A., Harris, C.R.** (1990) Enhanced degradation of insecticides in soils. In: Racke, K.D., Coats, J.R., (Eds) *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*, American Chemical Society, Washington, DC, pp 82-96.
29. **Dragun, J., Kuffner, A.C. and Schneiter, R.W.**, 1984. Groundwater contamination. 1. Transport and transformation of organic chemicals. *Chem. Eng.* 91, 65–70.
30. **Casida J, Quistad G**, 2004. Organophosphate Toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol* 17:983–998.

31. **EPA (U.S. Environmental Protection Agency).** 2012. Pesticides Industry Sales and Usage 2008- 2012 Market Estimates.
32. **ECPA (European Crop Protection Association), co-operation with EUROSTAT & European Commission.** 2007. The Use of Plant Protection Products in the European Union.
33. **EPA (U.S. Environmental Protection Agency).** 2013. Recognition and Management of Pesticide Poisonings: Sixth Edition: 2013. Chapter 5: Organophosphates.
34. **Galloway, T. and Handy, R.,** 2003. Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicology* 12, 345–363.
35. **Ragnarsdottir, K.V.,** 2000. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *J. Geol. Soc.* 157, 859–876.
36. **Kavalci C, Durukan P, Ozer M, Cevik Y, Kavalci G,** 2009. Organophosphate poisoning due to a wheat bagel. *Inter Med* 48:85–88.
37. **Sogorb, M.A. and Vilanova, E.,** 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128, 215–228.
38. **Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment,** 1999. Organophosphates. Chapter 3: The nature of OPs and their use.
39. **Head, I.J., Cain, R.B., & Sueet, D.L.,** 1990. Molecular aspects of enhanced microbial degradation of pesticides. In: *Proceedings of pests and diseases.* Brighton, 907-916.
40. **Sethunathan, N. & Yoshida,** 1973. T. *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. *Can.J. Microbiol.* 19, 873–875.
41. **Singh, B. K. & Walker,** 2006. A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 428–471.
42. **Singh, B. K., Walker, A., Morgan, J. A. W. & Wright, D. J.,** 2003. Role of soil pH in the development of enhanced biodegradation of fenamiphos. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7035–7043.
43. **Barik, S. & Sethunathan, N.,** 1978. Biological hydrolysis of parathion in natural ecosystems. *J. Environ. Qual.,* 7, 346-8.
44. **Racke KD, Laskowski DA & Schultz MR,** 1990. Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil. *J Agric Food Chem* 38: 1430–1436.
45. **Singh BK, Kuhad RC, Singh A, Lal R & Triapthi KK,** 1999. Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Crit Rev Biotechnol* 19: 197–225.
46. **Brajesh K. Singh,** 2009. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nature Reviews microbiology*, Volume 7, 156-164.
47. **Sethunathan, N.,** 1971. Biodegradation of diazinon in paddy fields as a cause of its inefficiency for controlling brown planthoppers in rice fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 17, 18–19.
48. **Sethunathan, N. and Pathak, M.D.,** 1972. Increased biological hydrolysis of diazinon after repeated application in rice paddies. *J. Agric. Food Chem.* 20, 586–589.

49. **Racke, K.D. and Coats, R.J.**, 1987. Enhanced degradation of isofenphos by soil microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 35, 94–99.
50. **Suett, D.L. and Jukes, A.A.**, 1997. The accelerated biodegradation of phorate in carrot soils in the United Kingdom. *Crop Protect* 16, 457–461.
51. **Smelt, J.H., Crum, S.J.H., Teunissen, W. and Leistra, M.**, 1987. Accelerated transformation of aldicarb, oxamyl and ethoprophos after repeated soil treatments. *Crop Protect* 6, 295–303.
52. **Karpouzas, D.G., Giannakou, I.O., Walker, A. and Gowen, S.R.**, 1999b. Reduction in biological efficacy of ethoprophos in a soil from Greece due to enhanced biodegradation: comparing bioassay with laboratory incubation data. *Pestic. Sci.* 55, 1089–1094.
53. **Juan Salvador Chin-Pampillo & Elizabeth Carazo-Rojas & Greivin Pérez-Rojas & Víctor Castro-Gutiérrez & Carlos E. Rodríguez-Rodríguez**, 2015. Accelerated biodegradation of selected nematicides in tropical crop soils from Costa Rica. *Environ Sci Pollut Res* (2015) 22:1240–1249.
54. **Brajesh K. Singh, Allan Walker, J. Alun W. Morgan, and Denis J. Wright**, 2003. Role of Soil pH in the Development of Enhanced Biodegradation of Fenamiphos. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Dec. 2003, p. 7035–7043
55. **Karpouzas, D.G., Hatziapostolou, P., Papadopoulou-Mourkidou, E., Georgiadou, A. and Giannakou, I.O.**, 2004a. The enhanced biodegradation of fenamiphos in soils from previously treated field sites in Greece and the effect of soil fumigants on the development of the phenomenon. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2099–2107.
56. **Caceres, T., Megharaj, M., Malik, S., Beer, M., Naidu, R.**, 2009. Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. in pure culture and groundwater. *Bioresour Technol.* 100: 2732–2736.
57. **Chanika E., Georgiadou D, Soueref E., Karas P., Karanasios E., Tsiropoulos N.G., Tzortzakakis E.A., Karpouzas D.G.**, 2011. Isolation of soil bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticides. *Bioresour Technol* 102: 3184-3192.
58. **Dimitrios G. Karpouzas, Anastasia Fotopoulou, Urania Menkissoglu-Spiroudi, Brajesh K. Singh**, 2005. Non-specific biodegradation of the organophosphorus pesticides, cadusafos and ethoprophos, by two bacterial isolates. *FEMS Microbiology Ecology* 53 (2005) 369–378.
59. **Singh, B.K., Walker, A., Morgan, J.A.W. and Wright, D.J.**, 2003. Effect of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5198–5206.
60. **Li Yang, Yu-hua Zhao, Bing-xin Zhang, Ching-Hong Yang, Xin Zhang**, 2005. Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium. *FEMS Microbiology Letters* 251 (2005) 67–73.
61. **Singh, B. K., Walker, A. & Wright, D. J.**, 2005. Crossenhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soils: dependence on structural similarity of compounds. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1675–1682

62. **Dimitrios G. Karpouzas, Evangelos Karanasios, Urania Menkissoglu-Spiroudi**, 2004. Enhanced microbial degradation of cadusafos in soils from potato monoculture: demonstration and characterization. *Chemosphere* 56, 549–559.
63. **Racke, K.D., Coats, J.R.**, 1988. Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: specificity of enhanced microbial degradation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38, 193–199.
64. **Mitchell, J.A., Cain, R.B.**, 1996. Rapid onset of the accelerated degradation of dicarboximide fungicides in a UK soil with a long history of agrochemicals exclusion. *Pesticide Science* 48, 1–11.
65. **Dimitrios G. Karpouzas and Brajesh K. Singh**, 2006. Microbial Degradation of Organophosphorus Xenobiotics: Metabolic Pathways and Molecular Basis. *ADVANCES IN MICROBIAL PHYSIOLOGY VOL. 51* ISBN 0-12-027751-4.
66. **Omar SA**, 1998. Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi. *Biodegradation* 9: 327–336.
67. **Brajesh K. Singh, Allan Walker, J. Alun W. Morgan, and Denis J. Wright**, 2004. Biodegradation of Chlorpyrifos by Enterobacter Strain B-14 and Its Use in Bioremediation of Contaminated Soils. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Aug. 2004, p. 4855–4863.
68. **Shuyan Denga, Yao Chena, Daosheng Wangb, Taozhong Shia, Xiangwei Wua, Xin Maa, Xiangqiong Li a, Rimao Huaa, Xinyun Tangb, Qing X. Li**, 2015. Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas* sp. G1. *Journal of Hazardous Materials* 297 (2015) 17–24.
69. **Jayanthi Abraham, Sivagnanam Silambarasan, Peter Logeswari**, 2014. Simultaneous degradation of organophosphorus and organochlorine pesticides by bacterial consortium. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 45 (2014) 2590–2596.
70. **Peng Lu, Qinfen Li, Hongming Liu, Zhaozhong Feng, Xin Yan, Qing Hong, Shunpeng Li**, 2013. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1. *Bioresource Technology* 127 (2013) 337–342.
71. **Sivagnanam Silambarasan, Jayanthi Abraham**, 2013. Kinetic studies on enhancement of degradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP by a newly isolated *Alcaligenes* sp. JAS1. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44 (2013) 438–445.
72. **Karpouzas D.G., Morgan J.A.W., Walker A.**, 2000a. Isolation and characterization of ethoprophos-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 33, 209-218.
73. **Karpouzas D.G., Walker A.**, 2000b. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* strains epl and epll to degrade the organophosphate ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 40-48
74. **L. T. Ou and J. E. Thomas**, 1994. Influence of Soil Organic Matter and Soil Surfaces on a Bacterial Consortium that Mineralizes Fenamiphos. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58:1148-1153.
75. **Manahan S.E.**, 1992. Toxicological chemistry, 2nd ed. Lewis, London.
76. **United states environment agency EPA- Office of Prevention**, 2014. Pesticides and Toxic Substances. Conditional Registration of the pesticide fosthiazate

77. **Qin S, Gan J, Liu W and Becker JO**, 2004. Degradation and adsorption of fosthiazate in soil. *J Agric Food Chem* 52:6239–6242.
78. **Pantelelis, I., Karpouzas, D.G., Menkissoglu-Spiroudi, U., Tsiropoulos N.**, 2006. Influence of soil physicochemical and biological properties on the degradation and adsorption of the nematicide fosthiazate. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6783–6789.
79. **Burns, R. G.**, 1976. Microbial control of pesticide persistence in soil. In *The Persistence of Insecticides and Herbicides* Beynon, K., Ed.; British Crop Protection Council Publications: London, U.K., pp 229-239.
80. **Dimitrios G. Karpouzas, Ioannis Pantelelis, Urania Menkissoglu-Spiroudi, Evangelia Golia, Nikolas G. Tsiropoulos**, 2007. Leaching of the organophosphorus nematicide Fosthiazate. *Chemosphere* 68 1359–1364.
81. **Osborn RK, Edwards SG, Wilcox A and Haydock PPJ**, 2010. Potential enhancement of degradation of the nematicides aldicarb, oxamyl and fosthiazate in UK agricultural soils through repeated applications. *Pest Manag Sci* 66: 253–261
82. **J. Alfonso Cabrera, Andreas Kurtz, Richard A. Sikora, Alexander Schouten**, 2010. Isolation and characterization of fenamiphos degrading bacteria. *Biodegradation* (2010) 21:1017–1027.
83. **Papadopoulou E.S, Lagos S., Spentza F., Vidiadakis E., Karas P.A, Klitsinaris T., Karpouzas D.G.**, 2016. The dissipation of fipronil, chlorpyrifos, fosthiazate and ethoprophos in soils from potato monoculture areas: first evidence for the development of enhanced biodegradation of fosthiazate. *Pest Manag Sci* 72: 1040-1050
84. **M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, L. M. Ravelo-Pérez M. A., Rodríguez-Delgado**, 2010. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Volume 396, Issue 6, pp 2307–2319.
85. **Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ**, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697-703
86. **GERARD MUYZER, ELLEN C. DE WAAL, AND ANDRE G. UITIERLINDEN**, 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, P. 695-70
87. **Gouy M., Guindon S. & Gascuel O.**, 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* **27(2)**:221-224.
88. **Edgar, R.C.**, 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity *BMC Bioinformatics*, (5) 113
89. **Castresana, J.**, 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17, 540-552.
90. **Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O.**, 2010. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic Biology*, 59(3):307-21.

91. **FOCUS**, 2006. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version, 2.0, 2006, 434 pp.
92. **Ying Huang, Beifang Niu, Ying Gao, Limin Fu and Weizhong Li.**, 2010. CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*, vol 26: 680-682.
93. **Vandamme P, Coenye T.**, 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54(Pt 6):2285-9.
94. **Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, Boon N, Crul K, Maertens S, Höfte M, Vos PD, Verstraete W, Top EM.** 2003. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Appl Environ Microbiol* 69:1532–1541
95. **Philip Breugelmans, Pieter-Jan D’Huys, Ren’ e De Mot & Dirk Springael**, 2007. Characterization of novel linuron-mineralizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol* 62 74–385.
96. **Sebastian R. Sørensen, Christian N. Albers, and Jens Aamand**, 2008. Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 2332–2340.
97. **Daniel Smith, Sam Alvey, David E. Crowley**, 2004. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology* 53 265–273.
98. **Zhang HJ., Zhou QW., Zhou GC., Cao YM., Dai YJ., Ji WW., Shang GD., Yuan S.**, 2012. Biotransformation of the neonicotinoid insecticide thiacloprid by the bacterium *Variovorax boronicumulans* strain J1 and mediation of the major metabolic pathway by nitrile hydratase. *J Agric Food Chem* 60: 153-159.
99. **Liu ZH., Cao YM, Zhou QW., Guo K., Ge F., Hou JY., Hu SY, Yuan S., Dai YJ.**, 2013. Acrylamide biodegradation ability and plant growth-promoting properties of *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969. *Biodegradation* 24: 855-864.
100. **Choi, Min-Kyeong, Kyung-Duk Kim, Kyong-Mok Ahn, Dong-Hyun Shin, Jae-Hong Hwang, Chi Nam Seong, and Jong-Ok Ka**, 2009. Genetic and Phenotypic Diversity of Parathion-Degrading Bacteria Isolated from Rice Paddy Soils.
101. **Lykidis A, Pérez-Pantoja D, Ledger T, Mavromatis K, Anderson IJ, Ivanova NN, et al.**, 2010. The Complete Multipartite Genome Sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a Versatile Pollutant Degradator. *PLoS ONE* 5: e9729.
102. **Trefault N, De la Iglesia R, Molina AM, Manzano M, Ledger T, et al.**, 2004. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ Microbiol* 6: 655–668
103. **Lizhen Han, Degang Zhao, and Cuicui Li**, 2014. Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71. *Braz J Microbiol*. 46(2): 433–441.

- 104. Xiangwei Wu, Wenbo Wang, Junwei Liu, Dandan Pan, Xiaohui Tu, Pei Lv, Yi Wang, Haiqun Cao, Yawen Wang, and Rimao Hua, 2017. Rapid Biodegradation of the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by *Cupriavidus gilardii* T-1. *J. Agric. Food Chem.*, 65 (18), pp 3711–3720**
- 105. Víctor Castro-Gutiérrez, Mario Masís-Mora, Glòria Caminal, Teresa Vicent, Elizabeth Carazo-Rojas, Marielos Mora-López, Carlos E. Rodríguez-Rodríguez, 2016. A microbial consortium from a biomixture swiftly degrades high concentrations of carbofuran in fluidized-bed reactors. *Process Biochemistry* 51 (2016) 1585–1593.**
- 106. R. Rani, R. Lal, G.S. Kanade and A. Juwarkar, 2009. Isolation and characterization of a phorate degrading bacterium. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 49 112–116.**